

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Triinu Arjus

Hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede regulatsioon anoksilises keskkonnas

Bakalaureusetöö

Juhendaja Joachim Matthias Gerhold, PhD

TARTU 2018

Infoleht

Hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede regulatsioon anoksilises keskkonnas

Õhulõhed on taime lehtedel ning vartel asuvad avased, millede kaudu toimub gaasivahetus ümbritseva keskkonnaga. Vastavalt keskkonnamuutustele reguleerivad õhulõhe avatust seda ümbritsevad kaks sulgrakku, mis võimaldavad taimel kiirelt reageerida muutustele. Teadmised õhulõhede regulatsioonist ning sulgrakkude metabolismist on veel lünklikud, kuid on teada, et sulgrakkude metabolism erineb ülejäänud taime rakkude omast. Kuna sulgrakkudes on oluline suhkrute kasutamine ning mitokondrite töö õhulõhede avanemisel on käesoleva töö eesmärgiks uurida anoksia mõju õhulõhede reageerimisvõimele. Selleks kasutati hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 liini taimi ja gaasivahetuseksperimenti käigus jälgiti õhulõhede juhtivust nende avatuse ja reageerimise hindamiseks. Tulemustest selgus, et õhulõhed reageerivad anoksiale sulgumisega ning anoksilises keskkonnas on õhulõhede reageerimine häiritud.

Õhulõhe, valgus, süsihappegaas, anoksia, sulgrakk, gaasivahetus

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia

The regulation of *Arabidopsis thaliana*'s stomatal movements in anoxic environment

Stomata are small pores in plants' leaves or stems, through which the gas exchange with surrounding environment takes place. Changes in the surrounding environment trigger stomatal movements with the help of two guard cells surrounding the pore, which is the plant's way to react rather quickly to various changes. Knowledge of the stomatal aperture and guard cell metabolism isn't whole, however it is known that guard cell metabolism has differences from the rest of the plant's cells. Due to the importance of using sugars and mitochondrial involvement during stomatal opening this work studied the effect of anoxia on stomatal movements, using *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants to observe the stomatal conductance in order to evaluate stomatal openness and ability to react during gas-exchange. As a result the guard cells responded to anoxia by closing the stomata and anoxia inhibited the speed of stomatal movements.

Stomata, light, carbon dioxide, anoxia, guard cell, gas-exchange

CERCS: B310 Physiology of vascular plants

Sisukord

Infoleht.....	2
Sisukord.....	3
Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Õhulõhede regulatsioon.....	6
1.2 Õhulõhede ioonkanalid	7
1.3 Õhulõhede regulatsioon CO ₂ kontsentratsiooni muutustel	8
1.4 Õhulõhede reageerimine pimedusele ja valgusele	10
1.5 Sulgrakkude üldine suhkru metabolism.....	11
1.5.1. Kloroplastid ja fotosüntees	11
1.5.2. Mitokondrid ja hingamine	12
1.5.3. Tärklis ja malaat	13
1.6 Anoksia	14
2. Eksperimentaalosa	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja metoodika.....	17
2.2.1 Taimede kasvatamine	17
2.2.2 Katseapartuur.....	17
2.2.3 Katsete läbiviimine	19
2.2.5 Valgusele/pimedusele reageerimise katse	19
2.2.4 CO ₂ kontsentratsiooni muutustele reageerimise katse	19
2.2.6 Andmeanalüüs.....	20
2.3 Tulemused	21
2.3.1 Õhulõhede juhtivuse langus anoksia rakendamisel.....	21
2.3.2 CO ₂ kontsentratsiooni muutustele reageerimine	21
2.3.3 Pimedusele/valgusele reageerimine	24
2.4 Arutelu.....	27
Kokkuvõte.....	30
Resümee.....	31
Tänuavaldused	32
Kasutatud kirjandus.....	33
Lisad.....	38
Lihtlitsents	42

Kasutatud lühendid

ABA – abtsiishape

DCMU – 3-3,4-diklorofenüül-1,1-dimetüül urea, fotosünteesi inhibiitor

FADH₂ – flaviin adeniin dinukleotiid redutseeritud vormis

GORK – GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K⁺ CHANNEL

H⁺-ATPaas – ATP energiat kasutav prootonpump

KAT1 – POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1

KAT2 – POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2

MPK4/12 – MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4/12

OST1 – OPEN STOMATA 1

PATROL1 – PROTON ATPASE TRANSLOCATION CONTROL 1

PP2Cs – Type 2C protein phosphatases

ppm – *parts per million* (osakest miljoni osakese kohta)

QUACK1 – (QUICK –ACTIVATING ANION CHANNEL 1)

RHC1 – RESISTANT TO HIGH CO₂

ROS – Reactive oxygen species (reaktiivsed hapnikuühendid)

RuBisCO – ribuloos-1,5-bisfosfaat karboksülaas/oksügenaas

±SEM – Standard Error of the Mean (aritmeetilise keskmise standardviga)

SLAC1 – SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1

Sissejuhatus

Õhulõhed on taime lehe epidermises asuvad mikroskoopilised avaused, millede kaudu toimub taime gaasivahetus väliskeskkonnaga. Õhulõhede kaudu liigub ümbritsevast keskkonnast lehte süsihappegaas ning väljub fotosünteesi käigus vabanenud hapnik ning veeaur. Õhulõhe moodustub kahest sulgrakust, millede turgori muutmise abil reguleeritakse nende vahel asuva poori avatust. Avanemist soodustavad näiteks madal süsihappegaasi kontsentratsioon ja valgus, samas kui kõrge süsihappegaasi tase ning pimedus on sulgemisteguriteks. Sulgrakkude turgor muutub tänu ionide liikumisele läbi raku membraani – avanemisel pumbatakse rakk ioone täis ning nendele järgneb vesi. Täitunud sulgrakk võtab tänu erilisele ehitusele kaarja kuju, eemaldudes teisest sulgrakust ja seega avatakse nende vahel olev pilu. Lõhe sulgumine on vastupidine protsess, mille käigus liiguvad ionid rakust välja, järgmisena väljub vesi ning madala siserõhu tõttu kaotavad sulgrakud oma kaarja kuju. Tänu õhulõhede reguleerimisele suudab taim reageerida küllaltki kiiresti keskkonnamuutustele. Kuigi peamised regulatsiooni mehhanismid on teada ei ole siiski täielikku pilti kogu protsessi keerulistest radadest.

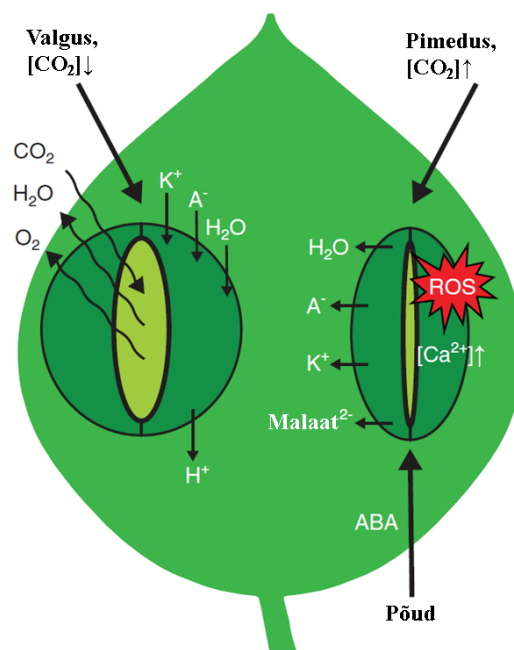
Käesoleva töö eesmärgiks oli jälgida hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede reageerimist anoksilises keskkonnas, kasutades stiimulitena süsihappegaasi kontsentratsiooni muutusi ning valgust ja pimedust. Katsete tegemisel kasutati gaasivahetuskambris kunstlikult kokku segatud õhku, tänu millele sai tekitada hapnikupuuduse. Katseseadme abil oli võimalik jälgida taime gaasivahetust ja sealt tulenevalt hinnata õhulõhede regulatsiooni. Katseandmetest sai arvutada kaudselt ka fotosünteesi aktiivsuse.

Töö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis organellide biokeemia ja taimsete signaalide uurimisgruppide koostöö projektina.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Õhulõhede regulatsioon

Õhulõhed on taimede lehtedel ja vartel asuvad väikesed poorid, mis on ümbritsetud kahe sulgrakuga. Poori kaudu toimub gaasivahetus ümbritseva keskkonnaga ning poori avatust reguleeritakse sulgrakkude abil. Õhulõhede kaudu liigub taime sisse fotosünteesiks vajalik süsihappegaas, samas kaotab taim transpiratsiooni kaudu ümbritsevasse keskkonda vett (Taiz *et al.*, 2014) Tänu transpiratsioonile tekib taimes mineraalide ja vee liikumine juurtest läbi varte üles taime lehtede poole. Sulgrakkude abil on õhulõhe võimeline reageerima minutite jooksul erinevatele keskkonnamuutustele, näiteks valguse intensiivsuse muutumise või madala süsihappegaasi kontsentratsiooni puhul (Lawson ja Blatt, 2014; Kollist *et al.*, 2014) sulgrakkudesse tekkinud turgori tõttu lõhed avanevad ning pimedus, ABA, patogeenide rünnak, saasteained või kõrge süsihappegaasi kontsentratsioon kutsub esile sulgrakkude turgori alanemise ning seetõttu lõhede sulgumise (Joonis 1). Lõhede avanemisel ja sulgumisel mängivad olulist rolliioonkanalid ning pumbad (Schroeder ja Hagiwara, 1989).



Joonis 1. Õhulõhe avatuna ja suletuna (Ehonen *et al.*, 2017). Sulgrakkudesse toimub katioonide (K^+), anioonide (A^-) ja vee (H_2O) sissevool valguse või madala CO_2 toimel. Avatud õhulõhedest toimub CO_2 sisenemine ning vee ja hapniku väljumine. Pimeduse, CO_2 kontsentratsiooni tõus või põud põhjustab kaaliumioonide, anioonide ja vee väljumist rakust, seega sulgedes õhulõhe. Originaaljoonist on muudetud.

Õhulõhe avanemisel aktiveeruvad plasmamembraanis asuvad H^+ -ATPaasid, mis pumpavad tsütoplastast prootoneid apoplasti, tekitades membraani hüperpolariseerituse (Assmann *et al.*, 1985). See omakorda aktiveerib polarisatsioonist sõltuvad K^+ kanalid, mille tulemusel liiguvad K^+ ioonid sulgrakkudesse (Schroeder *et al.*, 1984). Positiivsete laengute kompenseerimiseks liiguvad K^+ ionide järele ka negatiivse laenguga ühendid, milledest kõige tuntumad on Cl^- , NO_3^- ja malaat (Hetherington ja Woodward, 2003; Kollist *et al.*, 2014). Ioonide liikumise tulemusena tekib rakku madal veepotentsiaal, mis omakorda toob kaasa vee sisenemise rakku. Sulgraku mõõdud ja turgor kasvavad ning nad võtavad paisudes kaarja kuju, avades nende vahel asuva poori.

Lõhe sulgumisel inaktiveeritakse kõigepealt H^+ -ATPaas ja toimub Ca^{2+} kontsentratsiooni kasv rakus, seejärel aktiveeruvad anioonkanalid (Schroeder ja Hagiwara, 1989), millede kaudu liiguvad Cl^- , NO_3^- ja malaat rakust välja (Roelfsema ja Hedrich, 2005). H^+ -ATPaasi peatumine ning anioonide väljavool rakust põhjustavad rakumembraani depolarisatsiooni, mis aktiveerib K^+ rakust välja apoplasti transportivad kanalid (Schroeder *et al.*, 1984). Malaat konverteeritakse tagasi inaktiivseks tärgliseks (MacRobbie, 1998). Ioonide väljumisel tõuseb raku veepotentsiaal, mille tulemusel väljub rakust ka vesi. Vähenenud turgori tõttu vajuvad sulgrakud kokku ja sulgevad õhulõhe.

1.2 Õhulõhede ioonkanalid

Ioonkanalid on väga olulised sulgrakkude reageerimisel erinevatele stiimulitele, sest nende kaudu liiguvad ioonid läbi sulgrakkude membraanide. Ioonide liikumised põhjustavad membraanipotentsiaalide ning sulgraku turgori muutuseid ja vastavalt nendele kas õhulõhe avanemise või sulgumise.

Mutantseid pärmitüvesid kasutades avastati esimesena K^+ kanalid KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1) (Anderson *et al.*, 1992). KAT1 on *Shaker*-tüüpi K^+ ioone sulgrakkudesse sisse transportivad kanalid, mis aktiveeruvad plasmamembraani hüperpolarisatsiooni mõjul (Hedrich, 2012). KAT2 on samuti hüperpolarisatsiooni mõjul aktiveeruvad KAT1 homoloogsed *Shaker*-tüüpi kanalid, millede kaudu liiguvad K^+ ioonid sulgrakkudesse (Hedrich, 2012).

GORK (GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K^+ CHANNEL) on K^+ ioone sulgrakkudest välja suunav *Shaker*-tüüpi kanal, mille aktivatsioon sõltub sulgraku membraani depolariseeritusest ja kaaliumi ionide kontsentratsioonist sulgrakus. Lisaks mõjutab rakuväline pH GORK-i aktiivsust, soodustades kanali töötamist neutraalse pH juures (Ache *et al.*, 2000).

SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1) on aeglane S-tüüpi anioonkanal, mis avastati *Arabidopsis thaliana* mutandist, mille õhulõhede sulgumine oli takistatud (Negi *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2008). Üheks SLAC1 aktiivsust kontrollivaks proteiinkinaasiks on Raf-tüüpi HT1 (HIGH LEAF TEMPERATURE 1), mis on tugevalt CO₂-seoseline õhulõhede regulaator (Hörak *et al.*, 2016). SLAC1 aktivatsioonis osaleb ka OST1 (OPEN STOMATA 1) ning kanali kaudu liiguvad sulgrakust välja kloriidioonid (Cl⁻) ja nitraat (NO₃⁻) (Imes *et al.*, 2013).

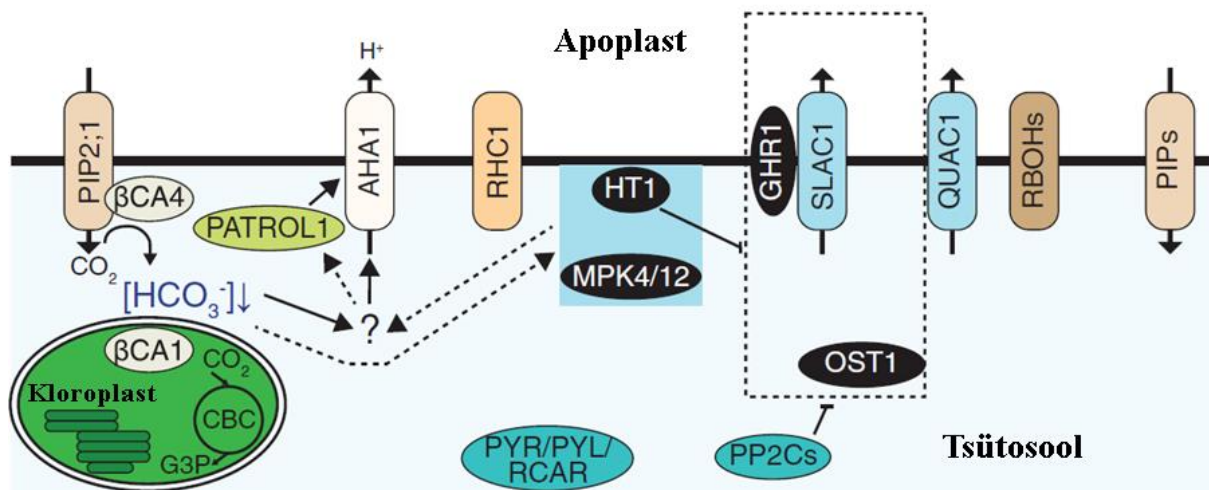
QUAC1 (QUICK –ACTIVATING ANION CHANNEL 1) on R-tüüpi anioonkanal, mis vahendab malaadi liikumist õhulõhede regulatsioonis ning kanal aktiveeritakse OST1 proteiinkinaasi poolt. Lisaks võib kanali aktiveerumist mõjutada apoplastiline malaat (Imes *et al.*, 2013).

1.3 Õhulõhede regulatsioon CO₂ kontsentratsiooni muutustel

Esimestena uurisid süsihappegaasi mõju õhulõhedele Freudenberger'i 1940. aastal ja Heath'i uurimisrühm 1948. aastal. Mõlemad leidsid, et madalal süsihappegaasi kontsentratsioonil toimub õhulõhede avanemine ning tavapärasest (~400ppm) kõrgem CO₂ tase põhjustab õhulõhede sulgumise (Freudenberger, 1940; Heath, 1948). Morison (1987) näitas oma katsetega, et ka isoleeritud õhulõhed, epidermise tükid, lehe tükid, ära lõigatud leht ja terved taimed olid võimelised reageerima CO₂ muutustele. Kahekordistatud CO₂ kontsentratsioon võis õhulõhede juhtivust vähendada kuni 40% (Morison, 1987). Atmosfääri süsihappegaasi kontsentratsiooni tõus suurendab lehtedesse siseneva CO₂ hulka kuid samas vähendab õhulõhede avatust ning juhtivust (Medlyn *et al.*, 2008). Kõrge CO₂ tase põhjustab lehepinnaühikul õhulõhede arvukuse vähenemist, tuues kaasa lehtede ülekuumenemise (Engineer *et al.*, 2016).

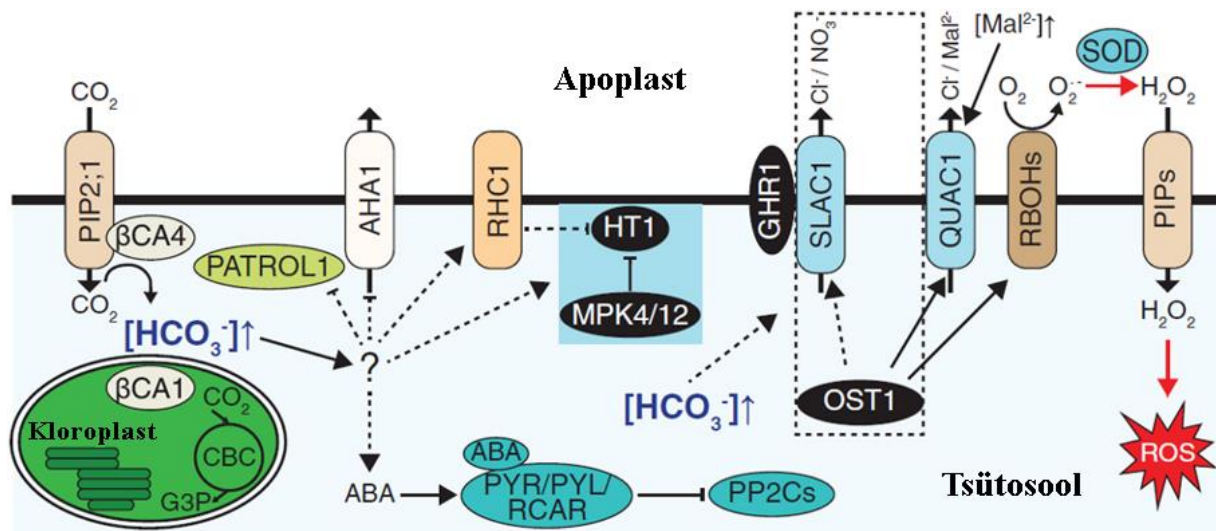
Teadmised CO₂ muutustele reageerimise molekulaarsest kaskaadist on veel lünklikud. On näidatud, et muutusi CO₂ kontsentratsioonis tajutakse lehe sees sulgrakkude all asuva ruumi ehk substomataalse õõnsuse CO₂ kontsentratsiooni kaudu (C_i). Muutused C_i-s mõjutavad mesofüllis toimuvat fotosünteesi ning põhjustavad õhulõhede reageerimist – kui fotosüntees toimub aktiivselt langeb C_i välisõhuga võrreldes madalamale tänu CO₂ kasutamisele ning lõhed on avatud (Mott, 1988). Õhulõhede reageerimine sõltub CO₂ konverteerimisest bikarbonaadiks (HCO₃⁻) (Hu *et al.*, 2015; Engineer *et al.*, 2016). Õhulõhed avanevad, kui CO₂ kontsentratsioon taime ümbritsevas keskkonnas langeb alla tavapärase või juhul kui CO₂-te seotakse piisavalt mesofüllis kloroplastides toimivas Calvin-Bensoni tsükli. Õhulõhede sulgemise puhul on C_i tõusnud üle tavapärase, mille üheks põhjuseks võib olla fotosünteesi lakkamine pimedas.

Akvaporiinide PIP2;1 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;1) kaudu siseneb süsihappegaas rakku, kus see muudetakse bikarbonaadiks (HCO_3^-) karboanhüdraaside βCA4 ja βCA1 poolt (DiMario *et al.*, 2017). Vastavalt bikarbonaadi kontsentratsioonile toimub õhulõhede avanemine (Joonis 2) või sulgumine (Joonis 3).



Joonis 2. Õhulõhede avanemise regulatsioon madala CO_2 taseme juures (Ehonen *et al.*, 2017). Tavalised jooned tähistavad eksperimentaalselt tõestatud signaalradu, katkendlikud jooned oletatavaid. Originaaljoonist on muudetud.

Õhulõhe avanemine algab H^+ -ATPaaside (AHA1) aktiveerumisega, põhjustades sulgraku membraani hüperpolarisatsiooni ja K^+ ionide sissevoolu (Assmann *et al.*, 1985). PATROL1 (PROTON ATPASE TRANSLOCATION CONTROL 1) mõjutab H^+ -ATPaaside translokatsiooni sulgraku sisemembraanidelt tsütoplasmamembraanile (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2013). On pakutud, et proteiinkinaasid HT1 ja MPK4/12 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4/12) võivad osaleda AHA1 aktivatsioonis (Ehonen *et al.*, 2017). Proteiinkinaasid GHR1 (GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE RESISTANCE 1) ja OST1 hoitakse inaktiivsetena proteiinfosfataaside PP2C-de ja proteiinkinaasi HT1 poolt (Ehonen *et al.*, 2017).



Joonis 3. Õhulõhede sulgumise regulatsioon kõrge CO₂ taseme juures (Ehonen *et al.*, 2017). Tavalised jooned tähistavad eksperimentaalselt tõestatud signaalradu, katkendlikud jooned oletatavaid. Originaaljoonist on muudetud.

Bikarbonaadi kontsentratsiooni tõus tsütosoolis põhjustab AHA1 inaktiveerumise (Merlot *et al.*, 2007) ning MPK4, MPK12 ja RHC1 (RESISTANT TO HIGH CO₂) poolt HT1 repressiooni (Ehonen *et al.*, 2017). Õhulõhede sulgumisel mängib olulist rolli fütohormoon abtsiishape (ABA), seondudes PYR/PYL/RCAR valkudega ja tekkinud kompleks inhibeerib PP2Cd (Belin *et al.*, 2006). Vabanenud OST1 aktiveerib SLAC1 ja QUAC1 anioonkanalid. QUAC1 aktivatsioonis osaleb ka apoplastis kõrgeenenud malaadi kontsentratsioon, mis on mesofüllil päritoluga signaal (Imes *et al.*, 2013).

1.4 Õhulõhede reageerimine pimedusele ja valgusele

Lisaks süsihappegaasile on pimedus oluline stiimul, mis põhjustab õhulõhede sulgumist. Kuna pimedas fotosünteesi toimuda ei saa pole taimel süsihappegaasi vaja, seetõttu on otstarbekas õhulõhed sulgeda, et piirata transpiratsiooni ja seega asjatut veekadu. Lisaks puudub vajadus lehti transpiratsiooni abil jahutada. Kuidas õhulõhede regulatsioon vastusena pimedusele täpselt välja näeb pole teada, küll aga on täheldatud, et kõik taimed ei sule öösel õhulõhesid täielikult (Snyder *et al.*, 2003; Caird *et al.*, 2007). Väheste uuringute tõttu ei osata nähtust täpselt seletada kuid on leitud, et õhulõhede avatus pimedas sõltub taimede kasvukeskkonnast (Snyder *et al.*, 2003; Bucci *et al.*, 2004). On hinnatud, et öine transpiratsioon moodustub ligikaudu 5-15% päevasest, vahel ka kuni 30% ning arvatavasti on öisel õhulõhede avatusel mingi roll taime kasvus osalemisel. (Caird *et al.*, 2007).

Õhulõhed reageerivad teadaolevalt kahte tüüpi valgusele – sinisele ja punasele (Shimazaki *et al.*, 2007). Sinist valgust tajutakse otse sulgrakkude plasmamembraanil asuvate fotoretseptoritega ning toimub prootonpumpade aktiveerimine membraani hüperpolariseerimiseks, punase valguse tajumine võib toimuda mesofüllide kloroplastide abil (Chen *et al.*, 2012). Punases valguses on õhulõhede avanemine seotud fotosünteesi aktiivsuse kasvamisega ning tänu sellele C_i langeb, mille vastusena lõhed avatakse (Roelfsema ja Hedrich, 2005). Seost punase valguse ja mesofüllide fotosünteesi aktiivsuse vahel näitas Fujita *et al.* (2013) oma töös, kus hariliku kummeliini (*Commelina communis*) lehe osa töödeldi tugeva fotosünteesi inhibiitoriga 3-(3,4-diklorofenüül)-1,1-dimetüül ureaga (DCMU) ning mille tagajärjel ei toimunud õhulõhede avanemist punases valguses aga valges valguses olid õhulõhed võimelised reageerima CO_2 muutustele. Võimalik, et ka valges valguses toimub õhulõhede avanemine sinise valguse retseptorite kaudu (Fujita *et al.*, 2013).

1.5 Sulgrakkude üldine suhkrute metabolism

Nagu eelnevalt mainitud, on õhulõhede avanemiseks vaja aktiveerida H^+ -ATPaasid ja katioonkanalid. Sulgrakkude plasmamembraanil asuvate sissepoole suunatud K^+ kanalite aktiivsus ja kloroplastide fotosünteesiline elektronide transport sõltuvad tsütosoolsest ATPst (adenosiintrifosfaadist) (Goh *et al.*, 2002). ATP on vajalik H^+ -ATPaaside toimimiseks õhulõhe avanemisel, lisaks toimub rakuväline ATP signaalmolekulina, osaledes taime kasvu ja stressitaluvuses ning ATP osalust õhulõhede sulgumisel võib seostada sulgemisel osalevate signaalmolekulide Ca^{2+} , NO ja H_2O_2 kogunemisega sulgrakku (Choi *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2014). Huvitaval kombel võib ATP roll olla seotud tema kontsentratsiooniga sulgrakus – madalal kontsentratsioonil (15-35 μM) toimub õhulõhede avanemine ning kõrgel (150-250 μM) sulgumine (Clark *et al.*, 2011). Peamiselt saadakse ATPd mitokondriaalsest hingamisest, tsütosoolsest glükolüüsist (Schwartz ja Zeiger, 1984) või oletatavasti ka rasvhapete β -oksüdatsioonist (McLachlan *et al.*, 2016), kuigi on välja pakutud, et ka kloroplastide valgusreaktsioonide tulemusel saadud ATPd võidakse kasutada sulgrakkudes kloroplastiväliselt (Tominaga *et al.*, 2001). Lisaks sulgrakkudes olevatele suhkrutele saavad mitokondrid ATP tootmiseks suhkruid ka mesofüllist importimise teel (Wang *et al.*, 2014), kuigi suhkrute transport apoplastist sulgrakku nõuab samuti energiat (Stadler *et al.*, 2003).

1.5.1. Kloroplastid ja fotosüntees

Kloroplastid on taimedes, vetikates ja osades algloomades leiduvad organellid, milles toimub oluline valgusest sõltuv fotosüntees. Fotosünteesi käigus kasutatakse valguse energiat süsiniku ja vee konverteerimiseks energeetilisteks ühenditeks, milleks on peamiselt

sahhariidid. Saadud suhkruid ladestatakse taimedes varuainetena, mida saab hiljem kasutada energiaallikana teistes metabolismiradades. Fotosünteesis eristatakse kahte põhilisemat etappi – valgusreaktsioonid, mille abil sünteesitakse makroergilisi ühendeid ATPd ja NADPHd (nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat) ning kõrvalsaadusena vabaneb õhulõhede kaudu hapnik. Teiseks fotosünteesi etapiks on Calvin-Bensoni tsükkel süsihappegaasi sidumiseks, kus kasutatakse valgusstaadiumist saadud makroergilisi ühendeid energiaallikana suhkrute tootmiseks (Michelet *et al.*, 2013).

Valgusstaadiumi reaktsioonides kantakse kloroplasti sees asuvate tylakoidide membraanidel elektrontransportahelas proteiinkomplekside abil ergastamise ja redoksreaktsioonide käigus edasi elektrone. Selle käigus tekitatakse tylakoidi luumenisse prootonite gradient. Prootonite gradienti kasutatakse ATP süntaasi poolt ATP tootmiseks. Lisaks ATP-le toodetakse ka NADPHd ja mõlemad makroergilisi ühendeid kasutatakse süsiniku sidumisel Calvin-Bensoni tsükli, kus lõppsaadusena vabaneb suhkrute lähteaine glütseeraldehüd-3-fosfaat (G3P). G3P konverteeritakse edasi suhkruteks, seetõttu on kloroplastide peamine ülesanne toota ja varustada rakke suhkrutega, mida kasutatakse teistes raku metabolismiradades.

Võrreldes mesofülliga on sulgrakkudes vähe kloroplaste (Willmer ja Fricker, 1996), seega on sulgrakkude fotosünteesiline võimekus võrreldes mesofülliga umbes 70% madalam (Shimazaki, 1989). Siiski on välja pakutud, et sulgrakkudes toimuv fotosüntees on oluline rakkudes turgori tekitamiseks (Azoulay-Shemer *et al.*, 2015), sest nende kloroplastid on võimelised tootma ATPd ja NADPHd (Outlaw *et al.*, 1981; Shimazaki, 1989). Veel teeb sulgrakkude kloroplastid eriliseks asjaolu, et nendes toimub tärgklise kogunemine ka pimedas ja aktiivne glükolüüs valguses, samas kui mesofüllis kloroplastides toimub tärgklisega majandamine vastupidi (Willmer ja Fricker, 1996). Järelikult on alust arvata, et suhkrute kasutamine sulgrakkudes mängib õhulõhede reguleerimisel olulist rolli (Daloso *et al.*, 2017).

1.5.2. Mitokondrid ja hingamine

Mitokondrid on enamikes eukarüootsetes rakkudes leiduvad organellid, mis toodavad suhkrutest või rasvhapetest ATPd, kasutades elektronide doonorina hapnikku. Kõrvalproduktina tekib CO₂ ja elektronide lõppakseptoriks on vesi. Protsess algab glükolüüsiga, mille käigus konverteeritakse glükoos püruvaadiks ning edasi atsetüül-CoAks. Atsetüül-CoA siseneb tsitraaditsükklisse, kus erinevate reaktsioonide tulemusel vabaneb CO₂, toodetakse NADHd ja FADH₂-te. Mitokondriaalse elektrontransportahela energiaallikana

kasutatakse glükolüüsi ja tsitraaditsükli toodetud NADHd ning FADH₂-te prootongradiendi tekitamiseks, mida omakorda kasutavad ATP süntaasid ATP tootmiseks (Saraste, 1999).

Taimede mitokondrid on võimelised kasutama alternatiivset hingamisrada tänu alternatiivsele oksüdaasile, mis on tsüaniidile resistentne (Vanlerberghe ja McIntosh, 1997). Alternatiivse oksüdaasi täpne roll pole teada aga on välja pakutud, et selle abil leevendatakse ROSide tingitud kahjustusi ning alternatiivse oksüdaasi inhibiitorite kasutamine soodustas ROSide teket. (Mackenzie ja McIntosh, 1999).

Sulgrakkudes on tavapärasest arvukamalt mitokondreid (Willmer ja Fricker, 1996) ja kõrgem hingamise aktiivsus võrreldes mesofülliga (Vani ja Raghavendra, 1994). Kinnitamaks mitokondrite hingamisahela olulisust sulgrakkudes näitas Raghavendra (1981) oma töös, et NADH (nikotiinamiid adeniin dinukleotiid) ja ATP (adenosiintrifosfaat) soodustasid õhulõhede avanemist ning et valguse käes oli õhulõhede avanemine piiratud, kui kasutuses olid hingamisahela inhibiitorid (Raghavendra, 1981). On teada, et kloroplastide valgusreaktsioonides toodetakse ATPd, mida aga suure tõenäosusega kloroplastidest välja ei transpordita, sest seda on vaja Calvin-Bensoni tsükli. Seega jääb mitokondrite vastutuseks varustada sulgrakku energiaga, kasutades ATP tootmiseks suhkruid, ning protsessi toimimiseks on vajalik hapniku olemasolu ehk hingamine.

1.5.3. Tärklis ja malaat

Hüpotees tärklise vajalikkusest õhulõhede avanemisel püstitati 1908. aastal, kui Lloyd täheldas sulgrakkudes madalat tärklise kontsentratsiooni päeva alguses. Järgnevate aastakümnete jooksul ei suudetud mitmete uurimistööde abil antud teooriat kas konkreetselt tõestada või ümber lükata (Daloso *et al.*, 2017). Aastal 1997 avaldatud töös siiski näidati, et metsiktüüpi taimedega võrrelduna oli tärklisevaestes hariliku müürlooga mutantides õhulõhede avamine häiritud, kui kasutati sinist valgust. Samas punase valguse käes mutantide ja metsiktüüpi taimede vahel silmnähtavaid erinevusi ei täheldatud (Lascève *et al.*, 1997). Edasised uuringud näitasid, et sulgrakkudes algab tärklise hüdroolüüs juba öösel ja jätkub umbes 1 tund valguse käes. Veel täheldati, et sinise valguse käes on tärklisevarud peaaegu täielikult kasutatud 30 minuti jooksul (Horrer *et al.*, 2016). Järelikult on võimalik, et tärklise hüdroolüüsi rada on täiendavalt aktiveeritud sinise valguse toimel (Lascève *et al.*, 1997; Horrer *et al.*, 2016).

Olulist õhulõhede regulatsioonis osalevat metaboliiti malaati toodetakse sulgrakkudes kloroplastidest pärinevast tärklisest, mitokondrite tsitraaditsüklist või imporditakse

mesofüllist (Daloso *et al.*, 2017). Üheks malaadi apoplastist sulgrakkudesse toimetamise teeks on ABC-tüüpi (ATP Binding Cassette) transporter AtABCB14, mis osaleb CO₂ muutustest tingitud õhulõhede regulatsioonis (Lee *et al.*, 2008). Huvitaval kombel on sulgrakud võimelised süsihappegaasi siduma nii RuBisCO (ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas/oksügenaas) kui ka PEPc (fosfoenoolpüruvaadi karboksülaas) poolt katalüüsitud reaktsioonide abil (Daloso *et al.*, 2015). PEPc poolt katalüüsitud CO₂ sidumine on iseloomulik C₄ taimedele ning on valguse käes olevates lehtedes oluline malaadi allikas (Tcherkez *et al.*, 2005). Antud protsessi käigus konverteeritakse HCO₃⁻ oksaalatsetaadiks ja sealt edasi NAD⁺-malaatdehüdrogenaasi vahendusel malaadiks.

Mitokondriaalselt sünteesitud malaadi saamiseks kasutatakse teoorias lisaks kloroplastilist päritolu tähtsusele ka triatsüülglütserooli, mis on β-oksüdatsiooni tsitraaditsükli süsinikuallikas. Seda teooriat toetab uurimus, kus leiti, et rasvatilgakesi kasutati õhulõhede avanemisel valguse käes ning mutantsete triatsüülglütserooli katabolismiga taimedes oli õhulõhede avanemine häiritud (McLachlan *et al.*, 2016).

Sulgumise korral konverteeritakse malaat glükoneogeneesi ja kloroplastide abil tagasi inaktiivseks tähtsuseks, kui sulgumine on indutseeritud kõrge CO₂ kontsentratsiooni poolt ning taim on valguse käes. Ilma valguseta ei aktiveeru kloroplasti elektrontranspordi süsteem, mis on vajalik redutseeriva jõu allikas tähtsuse sünteesil (Daloso *et al.*, 2017). Seetõttu algab tähtsuse süntees peale õhulõhede avamist hommikul (umbes tund peale koitu) ja jätkub kogu päeva jooksul, kuid huvitaval kombel kestab see öisel ajal veel ligi 3 tundi (Horrer *et al.*, 2016). Arvatavasti tuleb valguse käes tähtsuse sünteesiks vajalik substraat tsütosoolist kloroplasti trioosfosfaadi kujul ning NADPHd toodetakse kloroplasti elektrontransportahela abil, pimedas tuleb substraat aga glükoos-6-fosfaadina ja vajalikku NADPHd saadakse oksüdatiivse pentoosfosfaadi raja kaudu. Arvestades sulgrakkude metabolismi eripära on vähetõenäoline, et nende suhkruid eksporditakse mesofüllis (Daloso *et al.*, 2017).

1.6 Anoksia

Termin „anoksia“ tähendab bioloogias täielikku hapnikupuudust organismi elukeskkonnas, mis on hüpoksia ehk vähese hapniku ekstreemsem vorm. Hüpoksia puhul leidub keskkonnas vähesel määral hapnikku, mis mõjutab organismi metabolismi. Täielik hapnikupuudus keskkonnas ei ole looduses väga tõenäoline nähtus, sest Maa atmosfäär koosneb keskmiselt 21% hapnikust. Normoksia all on mõeldud 21% hapniku sisaldust organismi ümbritsevas keskkonnas. Siiski võivad taimed, eriti nende maa-alused osad või mulda külvatud seemned,

hapnikupuudusega kokku puutuda üleujutuste korral. Ka suurtes kudedes ei pruugi iga rakuni piisavalt hapnikku jõuda (Pfister-Sieber ja Brändle, 1994). Arvestades sulgrakkude suurt mitokondrite sisaldust ja, mesofüllli rakkudega võrreldes, suuremat hingamisaktiivsust, on anoksiliste (või hüpoksiliste) tingimuste kasutamine sulgrakkude uurimisel paljulubav lähenemine.

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Palju on tehtud katseid, et uurida õhulõhede reageerimist süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustele, valgusele ja pimedusele hapniku juuresolekul. Varasemalt on uuritud anoksia mõju taimetele (Pfister-Sieber ja Brändle, 1994) ja üleujutusest põhjustatud geeniekspressiooni muutuseid või õhulõhede sulgumist (Sojka, 1992; Sachs *et al.*, 1996), küll pole uuritud anoksia mõju õhulõhede juhtivusele, kui anoksiat on rakendatud terve taime rohelistele osadele. Antud töö eesmärgiks oli uurida:

- Kuidas taime õhulõhed reageerivad anoksiale
- kuidas taime õhulõhed reageerivad anoksilises keskkonnas CO₂ kontsentratsiooni muutustele
- kuidas taime õhulõhed reageerivad anoksilises keskkonnas pimedusele.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Taimede kasvatamine

Katsetes kasutatavad taimed olid hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 liini taimed (metsiktüüp). Seemneid leotati enne külvamist ööpäeva jooksul külmkapis (4°C) vees, et soodustada nende ühtlast idanemist. Taimede kasvatamiseks kasutati spetsiaalseid katseapartuuriga ühilduvaid potte (Kollist *et al.*, 2007). Antud potid on nelinurksed, 10 x 10 x 6 cm suured ja plastmassist, millede peale on 45° nurga all asetatud 10 x 10 cm kasvu-substraadiga kokku puutuv klaas. Klaasi keskel on umbes 3 mm läbimõõduga auk, kust taim läbi kasvab. Potid täideti 250g kasvusubstraadiga (kaks osa turvast ja üks osa vermikuliiti) ning sellele lisati vett poole jagu eelnevast mahust.

Seemnete külvamiseks kasutati automaatpipetti, tilgutades 3-5 seemet veesuspensioonis klaaskatte augu kaudu kasvusubstraadile. Niiskuse hoidmiseks asetati augu kohale tagurpidi väike Petri tass, mis eemaldati umbes nädala pärast peale esimeste idulehtede tekkimist. Peale katte eemaldamist harvendati taimi pintsettide abil, et igasse potti jääks kasvama üks taim.

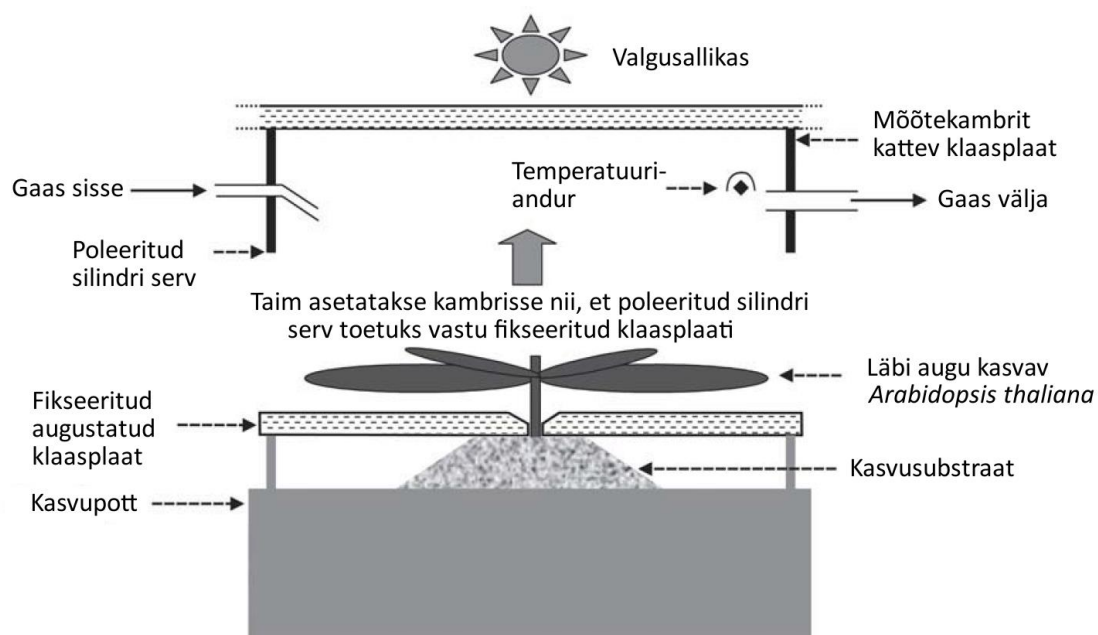
Taimi kasteti kord nädalas kaalu järgi altniisutuse meetodil. Pott asetati veega täidetud vanni kuni poti kogumass oli 340-360 grammi.

Taimed kasvasid kasvukambris (MCA1600, Snijders Scientific) 70% õhuniiskuse juures, valgusrežiimiga 12h valgust (23°C) ja 12h pimedust (20°C).

Katsetes kasutati 4-5 nädala vanuseid taimi.

2.2.2 Katseapartuur

Katsete tegemiseks kasutatav seade on arendatud ja ehitatud antud töögrupis. Seade koosneb mõõtekambrist, H₂O ja CO₂ analüsaatorist (LI-COR LI-6262), pumpadest, kolmest gaasiballoonist (N₂, O₂ ja CO₂), valgustist, arvutist ja termostaadist (Kollist *et al.*, 2007). Taim paigutatakse mõõtekambrisse altpoolt, asetades poti metallist vedru peale, mis hoiab potti klaaskatte kohalt tihedalt mõõtekambri vastas, samas taime leherosett jääb üleni kambrisse. Mõõtekamber on roostevabast terasest silinder, mis on kaetud klaasplaadiga. Silindri seina sees asub vesisärk, milles ringlev vesi läbib termostaadi ning mille abil kontrollitakse kambri temperatuuri. Mõõtekambri sees on ka temperatuuriandur (Joonis 4).



Joonis 4. Gaasivahetuskamber (Kollist *et al.*, 2007). Originaaljoonist on muudetud.

Kambrisse saab tekitada kunstliku õhu, segades omavahel N_2 , O_2 ja CO_2 katseteks vajalikes vahekordades. Lisaks on võimalik reguleerida gaasisegu veesisaldust ehk tekitada sobilik õhuniiskus.

Õhk siseneb kambrisse ühe silindris asuva avause kaudu ning väljub teisest, liikudes edasi analüsaatorisse. Tänu sellele saab leida sisenenud ja väljunud õhu CO_2 ja H_2O erinevused ning selle baasil jälgida taime reageerimist muutustele. Katse käigus registreeriti vaheldumisi kambrisse siseneva gaasisegu H_2O ja CO_2 kontsentratsioonid (referents väärtused) ja kambrist väljunud õhu CO_2 ja H_2O kontsentratsioonid. Vastavaid väärtusi sai katse ajal jälgida reaajas arvutiprogrammis jooksva graafikul.

Antud meetod võimaldab taime uurida ilma taimale olulist stressi ja kahjustusi tekitamata.

2.2.3 Katsete läbiviimine

Päev enne katse algust taimed vahatati – katteklassis olev avaus taime varre ümber täideti taimele kahjutu pookevahaga. Vahatamine on vajalik hermeetilisuse tagamiseks mõõtekambris ning teostati vähemalt päev varem, et vältida sellest tulenevat võimalikku stressi taimele ja seega ennetada katsete tulemuste mõjutamist.

Enne katse algust pildistati (kaamera mudel: SONY DSC-RX100) taime koos roseti kõrvale klaaskattele asetatud millimeetripaberi lõiguga (10 x 30 mm). Pildilt sai ImageJ-nimelise vabavaraga (Schneider *et al.*, 2012) määrata taime lehtede pindala, mida on vaja katsejärgsel andmete analüüsimisel.

Peale taime kambrisse asetamist lasti tal uue keskkonnaga kohaneda. Katse jooksul lasti peale igat stiimuli rakendamist taimel stabiliseeruda enne, kui rakendati uus muutus.

Anoksia tekitamiseks keerati O₂ ballooni kraan kinni ja lasti O₂ voolikusse jäänud rõhk välja, samal ajal kompenseeriti O₂ osa kunstõhust lämmastikuga, keerates N₂ ballooni kraani rohkem lahti. O₂ tagasi andmisel keerati paralleelselt O₂ balloon jälle lahti 21% peale ja N₂ balloon tagasi 78% peale.

2.2.5 Valgusele/pimedusele reageerimise katse

Katse alguses lasti taimel stabiliseeruda, seejärel lülitati valgustus välja ning kambri klaasosa kaeti kinni. Kui õhulõhede avatus tundus olevat stabiliseerunud valgus taastati ning oodati taas õhulõhede avatuse stabiliseerumist. Seejärel rakendati anoksia ja oodati õhulõhede avatuse stabiliseerumist. Pimedusele ning seejärel valgusele reageerimist korrati uuesti anoksilistes tingimustes. Katse lõpus taastati normaaltingimused. Kontrollimaks, kas anoksia rakendamine omab pikemaajalist mõju õhulõhede pimedusreaktsioonile tehti kahe taime puhul katse pööratud järjekorras, ehk kõigepealt mõõdeti reaktsioon pimedusele anoksilistes tingimustes ja seejärel normaaltingimustes.

2.2.4 CO₂ kontsentratsiooni muutustele reageerimise katse

Taimel lasti pärast kambrisse asetamist stabiliseeruda normaaltingimustel (O₂ 21%; CO₂ 400ppm). Peale taime stabiliseerumist tõsteti CO₂ kontsentratsioon 800 ppm-le. Kui õhulõhede avatus tundus stabiliseeruvat langetati CO₂ 400 ppm-le ning lasti taimel taas stabiliseeruda. Edasi rakendati anoksia ning korrati CO₂ kontsentratsiooni kahekordistamist ja langetamist. Lõpus anti O₂ tagasi, lastes taimel kambris taastuda.

Kontrollimaks, kas anoksia rakendamine omab pikemaajalist mõju õhulõhede CO₂ reaktsioonile tehti kahe taime puhul katse pööratud järjekorras, ehk kõigepealt mõõdeti reaktsioon CO₂ kontsentratsiooni tõstmisele anoksilistes tingimustes ja seejärel normaaltingimustes.

2.2.6 Andmeanalüüs

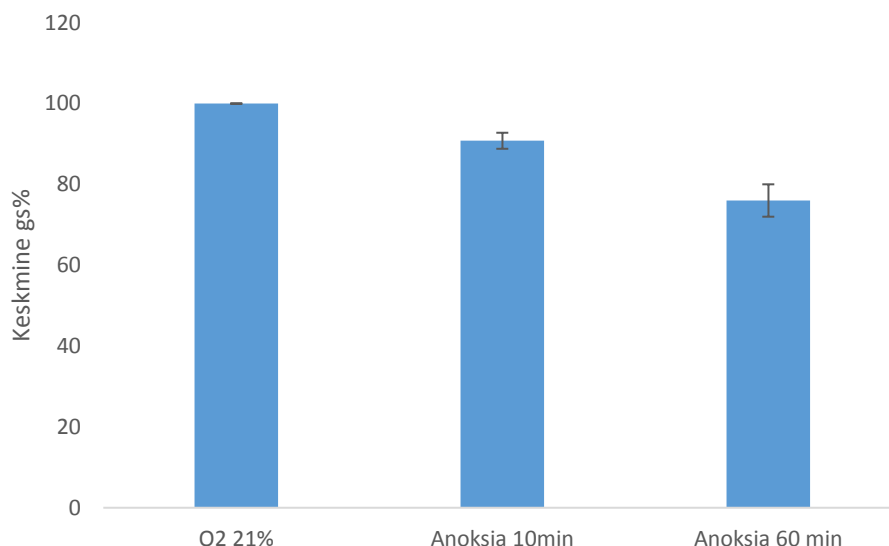
Katsetest saadud andmeid analüüsiti Microsoft Exceli (2013) abil. Andmeanalüüsi käigus arvutati katsetes mõõdetud väärtuste põhjal õhulõhede juhtivus (g_s) ja totaalne CO₂ neeldumine (P_n) (Kollist *et al.*, 2007).

Saadud õhulõhede juhtivused keskmistati ning võrreldi omavahel normaalhapniku ning anoksia ajapunkte. Tulbad standardiseeriti vastava katse algväärtuse suhtes.

2.3 Tulemused

Katsetes mõõdeti õhulõhede juhtivust normaalhapniku juuresolekul ja anoksias ning vaadati, kuidas juhtivus muutub: üleminekul normaalhapnikult anoksiale, kahekordse CO₂ kontsentratsiooni ning pimeduse rakendamisel. Saadud tulemused võimaldavad võrrelda õhulõhede reageerimise võimet stiimulitele hapniku juuresolekul ja anoksias.

2.3.1 Õhulõhede juhtivuse langus anoksia rakendamisel



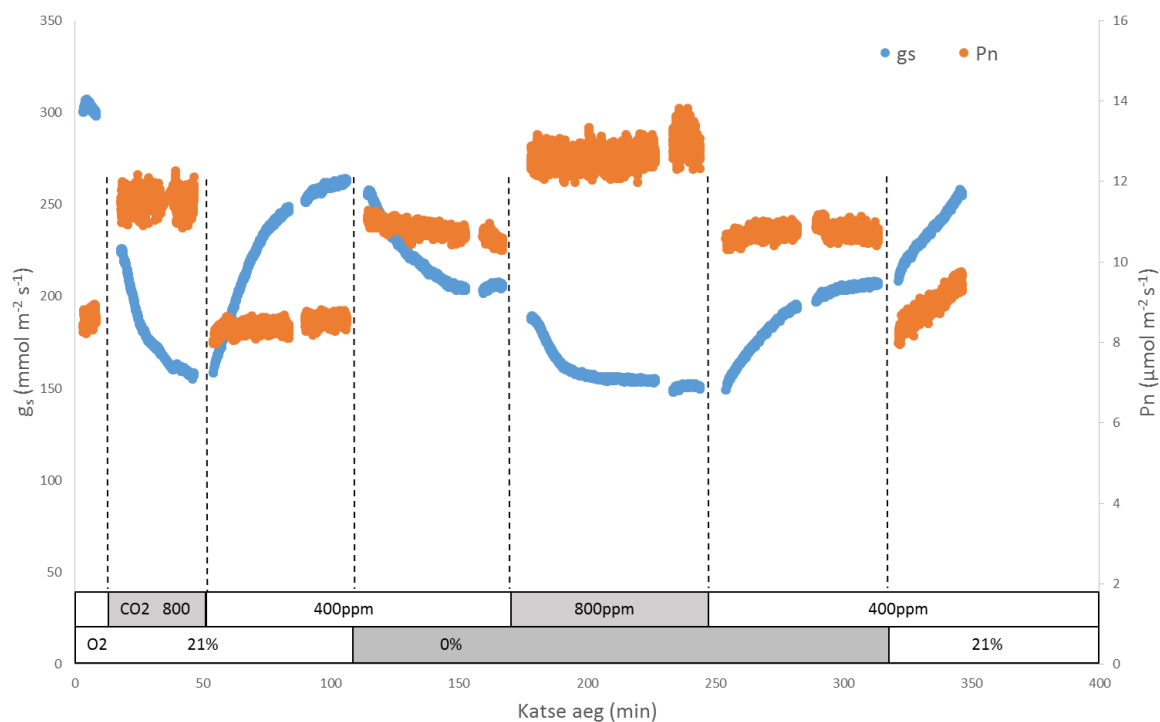
Joonis 5. Õhulõhede juhtivuse vähenemine anoksia jooksul. Tulemused on standardiseeritud esimese tulba suhtes. Kasutatud on 8 katse tulemusi.

Peale anoksia tekitamist toimus õhulõhede juhtivuse vähenemine. Võrreldes hapniku juuresolekul saadud keskmise juhtivusega oli 10 minuti pärast õhulõhede juhtivus langenud keskmiselt 9% ning tunni aja möödudes 24%.

2.3.2 CO₂ kontsentratsiooni muutustele reageerimine

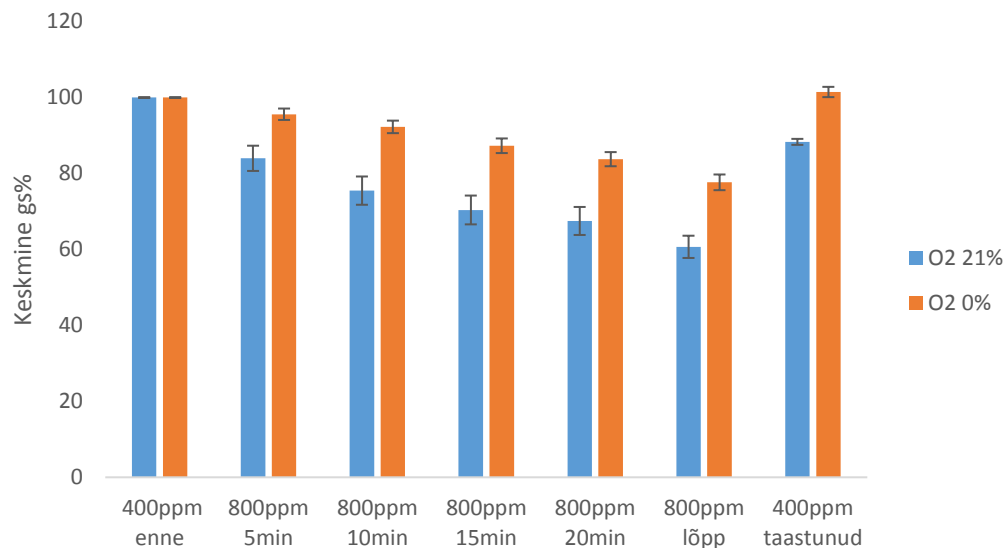
Katsetes mõõdeti õhulõhede reageerimist normaalse (400ppm) ning kahekordistatud süsihappegaasi kontsentratsioonile (800 ppm) hapniku juuresolekul ja ilma hapnikuta.

Katse alguses teostati kontroll, kus rakendati kahekordset CO₂ kontsentratsiooni (800ppm) hapniku juuresolekul ning täheldati, et õhulõhed sulguvad ootuspäraselt (Joonis 6, sinine joon). Anoksia rakendamine mõjus õhulõhede sulgumise stiimulina, sulgedes õhulõhed kindla nivoooni. Hiljem anoksias CO₂ 800ppm kontsentratsiooni rakendamisel jätkus õhulõhede sulgumine ning jõudis normoksias saadud nivoooni.



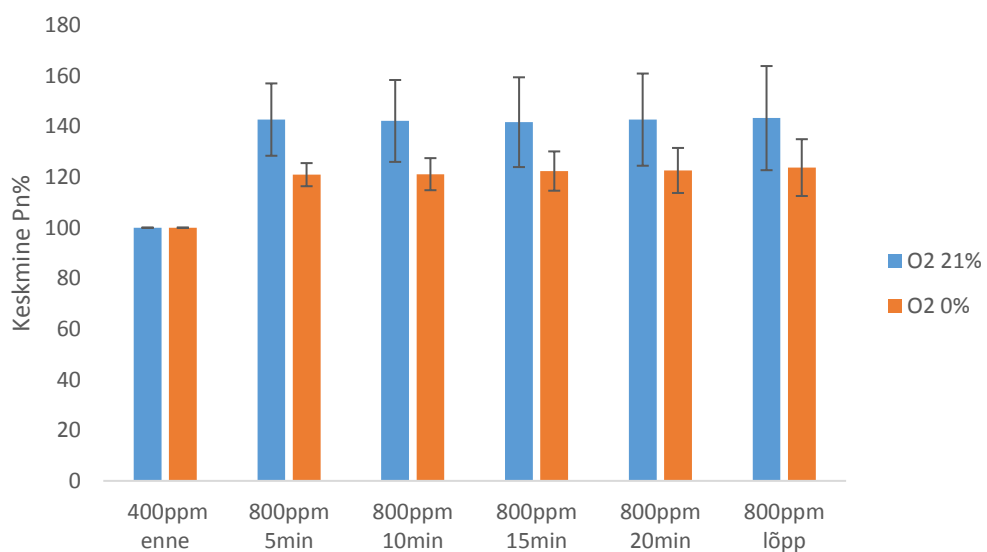
Joonis 6. Õhulõhede reageerimine süsihappegaasi erinevatele kontsentratsioonidele normoksias ning anoksias. Joonisel lisaks fotosünteesi aktiivsus. Sinisega on tähistatud õhulõhede juhtivus (g_s) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ja oranžiga fotosünteesi aktiivsus (P_n) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Korduskatsete graafikud on toodud Lisas 1.

Kui 21% hapniku juuresolekul tõsteti süsihappegaasi kontsentratsioon 400 ppm-lt 800 ppm-le, langes õhulõhede juhtivus 20 minuti jooksul keskmiselt 33% võrra (Joonis 7, sinised tulbad). CO_2 kontsentratsiooni tagasiviimisel 800 ppm-lt 400 ppm-le taastus õhulõhede juhtivus 88% võrreldes algse juhtivusega (Joonis 7, 400ppm enne ja 400ppm taastunud, sinised tulbad). Anoksia tekitamise järgselt langes juhtivus 1h pärast keskmiselt 21% võrrelduna enne anoksiat saadud taastumispunktiga. Anoksias langes õhulõhede juhtivus 20 minuti jooksul keskmiselt 16% (Joonis 7, oranžid tulbad). Anoksias taastus juhtivus 400ppm-l enne 800ppm rakendamist saadud tasemele (Joonis 7, 400ppm enne ja 400ppm taastunud, oranžid tulbad). Peale hapniku tagasiandmist olid õhulõhed võimelised avanemist jätkama.



Joonis 7. Keskmine õhulõhede juhtivuse vähenemine süsihappegaasi koguse kahekordistamisel. Tulemused on standardiseeritud esimese tulba suhtes. Kasutatud on nelja katse tulemusi. Võrreldud on normoksia ning anoksia keskmistatud tulemusi, lisaks märgitud \pm SEM (Standard Error of the Mean).

Hapniku juuresolekul tõsteti CO₂ kontsentratsioon 400 ppm-lt 800 ppm-le ning 20 minuti möödudes oli fotosünteesi aktiivsus tõusnud 43% võrreldes 400 ppm juures mõõdetud keskmise aktiivsusega (Joonis 8, sinised tulbad). Anoksias saadud fotosünteesi keskmine aktiivsuse tõus peale 800 ppm CO₂ rakendamist oli 20 minuti pärast 23% võrrelduna enne stiimuli rakendamist (Joonis 8, oranžid tulbad).



Joonis 8. Keskmine fotosünteesi aktiivsus süsihappegaasi koguse kahekordistamisel. Tulemused on standardiseeritud esimese tulba suhtes. Kasutatud on nelja katse tulemusi. Võrreldud on normoksia ning anoksia keskmistatud tulemusi, lisaks märgitud \pm SEM.

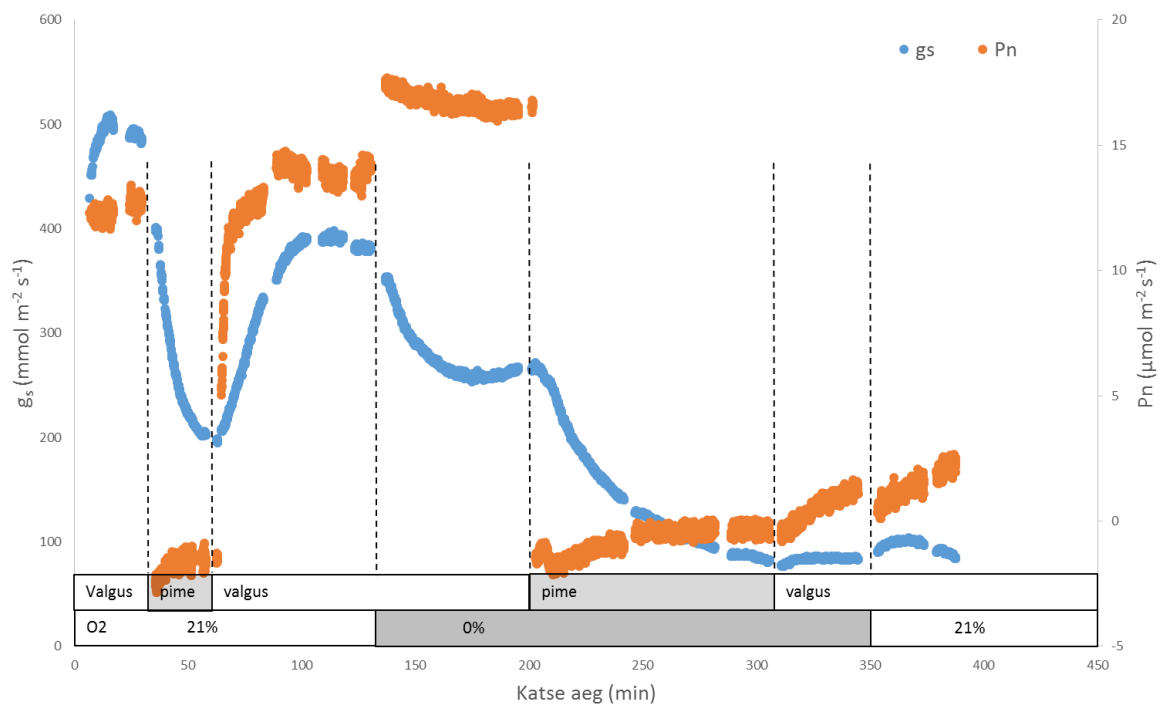
2.3.3 Pimedusele/valgusele reageerimine

Katse alguses teostati kontroll, kus hapniku juuresolekul rakendati stiimulina pimedust õhulõhede sulgumiseks ning hiljem uuesti lõhede avanemiseks valgust (Joonis 10, sinine joon). Valguse tagasi andmisel peale reaktsiooni kordamist anoksias täheldati, et taim oli anoksilises pimeduses kärbunud (Joonis 9). See selgitab, miks ei toimunud katse lõpus silmnähtavat õhulõhede juhtivuse taastumist.



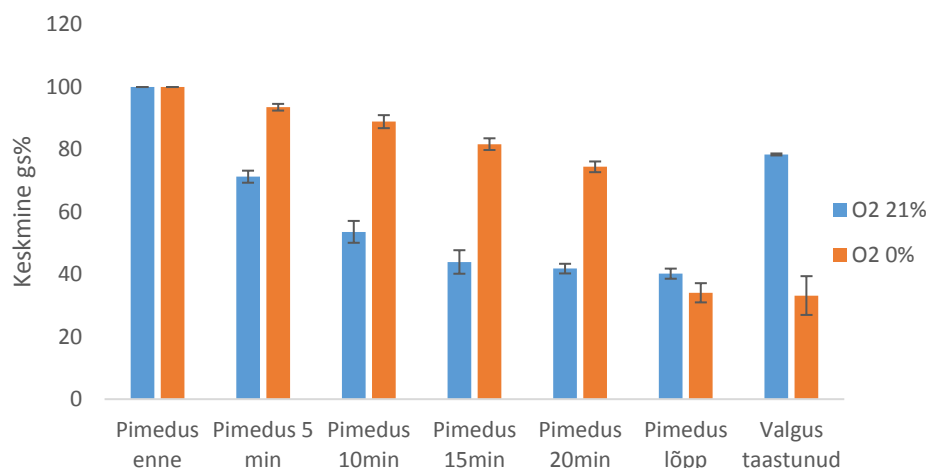
Joonis 9. Pimeduskatse taim enne ja pärast katse läbiviimist.

Hapniku juuresolekul toimus õhulõhede juhtivuse vähenemine pimedas ootuspäraselt (Joonis 10, sinine joon). Anoksia rakendamisel langes õhulõhede juhtivus keskmiselt 27%. Hiljem pimeduse rakendamisel langemine jätkus. Valguse tagasi andmisel ei toimunud silmnähtavat õhulõhede juhtivuse taastumist.



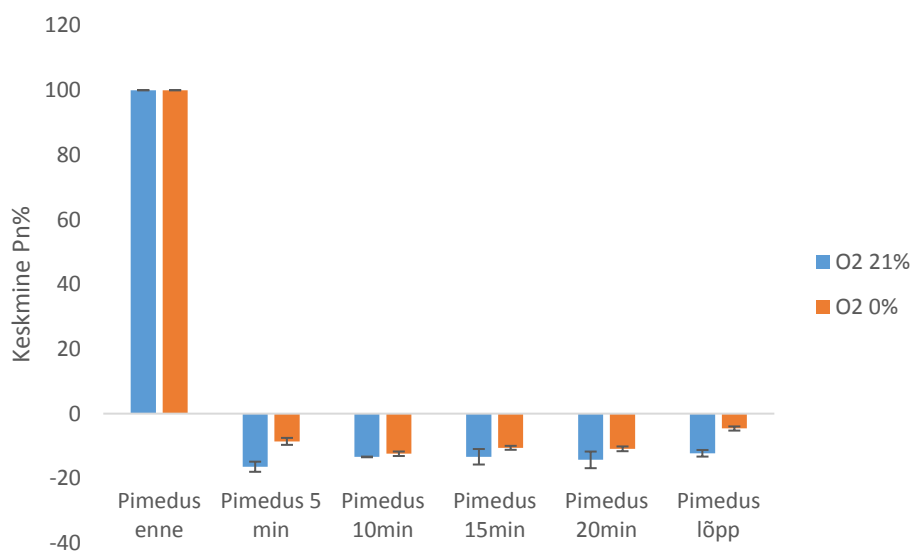
Joonis 10. Õhulõhede reageerimine valgusele ja pimedusele normoksias ning anoksias. Joonisel lisaks fotosünteesi aktiivsus. Sinisega on tähistatud õhulõhede juhtivus (g_s) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ja oranžiga fotosünteesi aktiivsus (P_n) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Korduskatsete graafikud on toodud Lisas 2.

21% hapniku juuresolekul pimedas langes õhulõhede juhtivus 20 minuti jooksul keskmiselt 58% võrra (Joonis 11, sinised tulbad). Valguse tagasiandmisel taastus õhulõhede keskmine juhtivus 78%. Anoksia tekitamise järgselt langes juhtivus 1h pärast 27% võrrelduna enne anoksiat saadud taastumispunktiga. Anoksias tekitatud pimeduses langes õhulõhede juhtivus 20 minuti jooksul keskmiselt 26% (Joonis 11, oranžid tulbad). Õhulõhede juhtivus ei taastunud katse lõpus, sest peale hapnikuta pimedas viibimist olid lehed silmnähtavalt kärbunud (Joonis 10) ja seega ei andnud usaldusväärseid tulemusi.



Joonis 11. Keskmine õhulõhede juhtivuse vähenemine pimeduses. Tulemused on standardiseeritud esimese tulba suhtes. Kasutatud on kahe katse tulemusi hapniku juuresolekul ning nelja katse tulemusi anoksias. Võrreldud on normoksia ning anoksia keskmistatud tulemusi \pm SEM.

Nii hapniku juuresolekul kui ka anoksias langes fotosünteesi keskmine aktiivsus pimedas negatiivse väärtuseni. 21% hapniku juures langes see valguse käes saadud aktiivsuse suhtes peale 20 minuti möödumist 114% (Joonis 12, sinised tulbad) ja anoksias 111% (Joonis 12, oranžid tulbad).



Joonis 12. Keskmine fotosünteesi aktiivsus pimeduses. Tulemused on standardiseeritud esimese tulba suhtes. Kasutatud on kahe katse tulemusi hapniku juuresolekul ning nelja katse tulemusi anoksias. Võrreldud on normoksia ning anoksia keskmistatud tulemusi \pm SEM.

2.4 Arutelu

Eelnevalt on teada, et õhulõhed sulguvad pimeduse või kõrge CO₂ kontsentratsiooni tõttu. Nii juhtus ka antud katses, kuigi anoksias reageerisid sulgrakud stiimulitele aeglasemalt. Aeglasemat reageerimist võib seletada sellega, et sulgrakkudes on vähe kloroplaste ja rohkelt mitokondreid (Willmer ja Fricker, 1996), seetõttu on alust arvata, et kloroplastid ei suuda võimaldada piisavalt energiat õhulõhede liigutamiseks ning glükolüüs ja mitokondriaalne hingamine on õhulõhede avanemiseks vajalikud. Ka anoksias võib kogu õhulõhede liigutamiseks vajalik energia pärineda mitokondritest, mida hoiavad töös kloroplastide valgusreaktsioonides toodetud hapnik.

Kuna sulgrakkude kloroplastide fotosünteesiline elektronide transport sõltub tsütosoolsest ATPst (Goh *et al.*, 2002), siis võib järeldada, et kloroplastides ei toodeta piisavalt autonoomset ATPd suhkrute sünteesiks. Seetõttu võib oletada, et kloroplastidest pärit ATPd pole energeetilisel põhjusel mõtet kasutada H⁺-ATPaaside energiaallikana ning ressurss on hoopis tsütosoolne ATP. Tsütosoolne ATP tuleb mitokondriaalsest hingamisest, tsütosoolsest glükolüüsist kui ka triatsüülglütserooli β -oksüdatsioonist (Schwartz ja Zeiger, 1984; McLachlan *et al.*, 2016). Varasemas töös näidati, et mitokondrite hingamisahela inhibeerimisel oli sulgrakkude avanemine häiritud (Raghavendra, 1981). See seletab ka, miks ei suutnud õhulõhed antud katsetes anoksias kiiresti reageerida. Nende võimekuse aeglaselt siiski reageerida tagas võib-olla rasvhapete β -oksüdatsioon.

Sulgrakkude ja mesofüllis vahel toimub metaboliitide vahetus ning suhkrute transport (Wang *et al.*, 2014), millest saab järeldada, et fotosünteesiliselt aktiivsemas mesofüllis toodetakse sulgrakkude jaoks lisasuhkruid. Anoksia korral on tärklise transport häiritud (Pfister-Sieber ja Brändle, 1994), seetõttu ei pruugi ATP tootmise jaoks suhkrud sulgrakkudes piisavalt jätkuda. Kui tugevasti inhibeerib anoksia suhkrute transporti mesofüllist sulgrakkudesse või kui kättesaadavad on anoksia korral sulgraku enda tärklise või rasvhapete tagavarad vajab veel uurimist. Võrdluseks antud töö katsetele sobivad sama katseskeemi järgi tehtud mõõtmised õhtusel või öisel ajal, kui sulgrakkude varuainete kontsentratsioon on kõrgem.

Süsihappegaasi katsetest oli näha, et anoksias tõusis õhulõhede juhtivus peale kõrge CO₂ rakendamist tagasi enne anoksias 400 ppm juures saadud juhtivusele. Arvatavasti tänu fotosünteesi abile oli taim võimeline kõrge CO₂ tõttu õhulõhede sulgumisest taastuma kuid anoksia takistas täielikku avanemist. Peale hapniku tagasi andmist avanesid õhulõhed edasi,

seega on ehk hapnikul eraldi iseseisev efekt õhulõhede avatusele. Antud nähtust tuleks lähemalt edasi uurida.

Lloyd täheldas 1908. aastal, et tärklis koguneb sulgrakkudesse öösel ja päeva esimestel tundidel on selle kogus võrreldes ööga madalam. Kuna töös kasutatud katseid alustati hommikul on valguskatsetes üheks taimede anoksias närbumise võimalikuks põhjuseks suhkrute puudus. Hapniku puudumisel hakkab toimuma ATP tootmiseks käärimisprotsess, mille tulemusel tekivad orgaanilised happed, etanool ja gaasid. Pimedas ei saa fotosüntees toimida ning ilma hapnikuta ei ole võimalik taimel efektiivselt metabolismi jätkata, mistõttu fermentatsiooni tõttu rakusisene langenud pH soodustab organellide lüüsumist ja seega rakkude surma. Valguse käes on fermentatsioonist tingitud lüüsumine välditud, sest fotosünteesi abil toodetakse nii mesofüllil kui ka sulgrakkude kloroplastides hapnikku, mida saab mitokondriaalses hingamises kasutada. Vaja oleks uurida, mis ajahetkest alates toimub anoksilises pimeduses lehtede kärbumine, peale mida ei ole mõõdetud õhulõhede juhtivuse tulemused usaldusväärsed. Lisaks tasub uurida, millest täpsemalt on kärbumine põhjustatud.

Stressiolukord põhjustab kõrvalekaldeid taime mitokondrite ning kloroplastide metabolismis, mistõttu tekivad ning kogunevad raku komponente oksüdeerivad reaktiivsed hapnikuühendid (ROS). ROSi üheks tekkeviisiks on rasvhapete β -oksüdatsioon (Suzuki *et al.*, 2011) ning arvestades anoksias inhibeeritud/puudulikku mitokondriaalset hingamist siis β -oksüdatsioon võib olla aktiivsem kui tavaliselt. Kuna taime metabolism on anoksias tasakaalust väljas võib pimedas lehtede kärbumises osaleda ka ROSi kuhjumisest põhjustatud kahjustused rakkudele.

Miks sulgrakud vastasid anoksia rakendamisele kui õhulõhede sulgemise stiimuline on raske öelda. Kuna teadmised õhulõhede regulatsioonist on lünklikud võib välja pakkuda, et hapnik käitub õhulõhede regulatsioonis signaalmolekulina või tundmatu signaalmolekuli aktiivsus/teke sõltub hapnikust.

Süsihappegaasi katsetes toimus fotosünteesi aktiivsuse tõus nii hapniku juuresolekul CO_2 kontsentratsiooni tõstmisel kui ka anoksias, mida võib seletada RuBisCO abil – RuBisCO on võimeline siduma ka hapnikku, põhjustades fotohingamist (Keys, 1986). Kuna anoksias RuBisCO hapnikku siduda ei saa asendatakse fotohingamise osaks seotud hapnik CO_2 -ga, mille kasutamistseostatakse fotosünteesiga. Valguskatsetes täheldati fotosünteesi aktiivsusest, et ilma hapnikuta pimedas taim „hingab“. Antud nähtus võib olla põhjustatud taimede närbumisest anoksilises pimedas, mis annab küsimusi tekitavaid tulemusi.

Peale katseid jälgiti taimi veel mõned päevad, mille jooksul täheldati valguskatsetes kasutatud taimede lehtedes valguse käes läbikumavaid laike. Kudedes on peale anoksia üleelamist järel vähe energiat ja tugevad redutseerivad jõud, mis põhjustavad radikaalide tekke purset peale hapniku tagasi andmist, tekitades post-anoksilisi kahjustusi. Suure tõenäosusega satuvad rünnaku alla polüküllastumata rasvahpped raku membraanides peroksüdeerumise ahelreaktsioonis, mis toob kaasa nii tsütoplasma membraani kui ka organellide membraanide lekkimised. (Pfister-Sieber ja Brändle, 1994). Lehtede läbikumavuse üheks seletuseks võib olla hapniku radikaalide poolt tekitatud kahjustused.

Edasisteks anoksia uuringuteks võiks kasutada esimese katseseeria jaoks defektse SLAC1 mutante ning jälgida nende õhulõhede reageerimist erinevatele stiimulitele anoksias. Kui defektse SLAC1 taimede katsed annavad metsiktüüpi taimedest erinevad tulemused siis võiks jätkuvates uuringutes kasutada defektse OST1 proteiinkinaasi või defektse HT1 mutante, näiteks *suu* (Hörak et al., 2016).

Kokkuvõte

Anoksia rakendamine mõjus sulgrakkudele kui õhulõhede sulgemise stiimulina, sest õhulõhede juhtivus langes. Hapnik võib olla signaalmolekul või hapnikust sõltub mõni tundmatu signaalraja komponent.

Katsetest saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et hapnikupuudus mõjutab õhulõhede juhtivust ning stiimulitele reageerimise kiirust, muutes nende reageerimise süsihappegaasi kontsentratsiooni muutusele ja valgusele/pimedusele anoksilises keskkonnas aeglasemaks. Aeglase reageerimise põhjusteks võib olla sulgrakkude vähene kloroplastide ning rohke mitokondrite arv, mis eeldab glükolüüsi kui peamist raku energiaallikat. Anoksia tõttu on mitokondriaalse ATP tootmine tugevalt häiritud, lisaks varuainete puudus sulgrakkudes katsete läbiviimise ajal ning häiritud suhkrute transport mesofüllist sulgrakkudesse võivad olla olulised tegurid aeglase reageerimise põhjustamisel. Lisaks ei suutnud õhulõhede juhtivused süsihappegaasi katsetes taastuda normoksias saadud nivooni, mille põhjuseks võib olla roll O_2 kui signaalmolekulina.

Ilma hapnikuta on taimedele valgus vajalik, sest anoksilises pimeduses toimus lehtede silmnähtav kärbumine. Pimeduses ei saa toimuda fotosüntees, mille abil saab taim toota õhulõhede liigutamiseks varuaineid ning hapnikku mitokondrite tööks. Selle asemel toimus tõenäoliselt rakkudes fermentatsioon, mille tulemusel tsütosooli pH langes ning mis omakorda põhjustas rakkude lüüsumist.

Resümee

The regulation of *Arabidopsis thaliana*'s stomatal movements in anoxic environment

Triinu Arjus

Summary

Stoma is a small opening in plant epidermis which is surrounded by two guard cells. Stomata mediate the gas exchange between the plant and surrounding environment – the CO₂ uptake is necessary for photosynthesis while losing vaporized water in return, which also helps to cool the leaves. In order to react to changes in surrounding environment the plants are able to adjust the stomatal aperture accordingly rather fast, either opening or closing the pore by changing turgor pressure of the guard cells. To open the stomata, ions and water move into the guard cells and to close it the ions and water move out. Some stimuli that open the stomata are presence of light or low CO₂ concentration while stimuli that close the stomata are darkness, elevated CO₂ levels or abscisic acid (ABA). The whole signaling cascade of the stomatal aperture is still not fully understood.

The aim of this research was to monitor the effect of anoxia on stomatal conductance while changing CO₂ concentration between 400 – 800 ppm or using light and darkness as stimuli. It was possible to measure stomatal movements by using whole plants in gas-exchange device, which measured the CO₂ uptake and water evaporation. The collected data was used to calculate the stomatal conductance, which helped to determine how much did the stomata open or close.

Stomata reacted to all stimuli accordingly, however stomatal movements were disturbed in the presence of anoxia, making them react slower than in the presence of oxygen. Interestingly the stomata slowly closed to a certain level after presenting anoxia to the plant, which indicates that lack of oxygen might be a signal for stomatal closure. In CO₂ experiments stomatal conductance during anoxia wasn't able to fully restore to the previous level, measured in the presence of normal oxygen levels. Plants that were treated with anoxia and darkness wilted near the end of the experiment, which indicates that light is essential in oxygen free environment.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Joachim Matthias Gerholdi vastutulelikkuse, abivalmiduse ja huvitavate teooriate väljakäimiste eest. Tänan ka Hannes Kollistit, kes oli lahkesti valmis abi osutama. Veel soovin tänada Mikk Välbet ja Ingmar Tulvat, kes aitasid katsete läbiviimisel ning tulemuste analüüsil, ja ülejäänud laborirahvast sõbraliku suhtumise eest.

Kasutatud kirjandus

- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., and Hedrich, R. (2000).** GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Letters* **486**:93–98.
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J., and Gaber, R. F. (1992).** Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:3736–3740.
- Assmann, S. M., Simoncini, L., and Schroeder, J. I. (1985).** Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**:285–287.
- Azoulay-Shemer, T., Palomares, A., Bagheri, A., Israelsson-Nordstrom, M., Engineer, C. B., Bargmann, B. O. R., Stephan, A. B., and Schroeder, J. (2015).** Guard cell photosynthesis is critical for stomatal turgor production, yet does not directly mediate CO₂- and ABA-induced stomatal closing. *The Plant Journal* **83**:567–581.
- Belin, C., Franco, P.-O. de, Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J.-M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S. (2006).** Identification of Features Regulating OST1 Kinase Activity and OST1 Function in Guard Cells. *Plant Physiology* **141**:1316–1327.
- Bucci, S. J., Scholz, F. G., Goldstein, G., Meinzer, F. C., Hinojosa, J. A., Hoffmann, W. A., and Franco, A. C. (2004).** Processes preventing nocturnal equilibration between leaf and soil water potential in tropical savanna woody species. *Tree Physiol* **24**:1119–1127.
- Caird, M. A., Richards, J. H., and Donovan, L. A. (2007).** Nighttime Stomatal Conductance and Transpiration in C₃ and C₄ Plants. *Plant Physiology* **143**:4–10.
- Cao, Y., Tanaka, K., Nguyen, C. T., and Stacey, G. (2014).** Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **20**:82–87.
- Chen, C., Xiao, Y.-G., Li, X., and Ni, M. (2012).** Light-Regulated Stomatal Aperture in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **5**:566–572.
- Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, Y., Lee, S. Y., and Stacey, G. (2014).** Identification of a Plant Receptor for Extracellular ATP. *Science* **343**:290–294.
- Clark, G., Fraley, D., Steinebrunner, I., Cervantes, A., Onyirimba, J., Liu, A., Torres, J., Tang, W., Kim, J., and Roux, S. J. (2011).** Extracellular Nucleotides and Apyrases Regulate Stomatal Aperture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156**:1740–1753.
- Daloso, D. M., Antunes, W. C., Pinheiro, D. P., Waquim, J. P., Araújo, W. L., Loureiro, M. E., Fernie, A. R., and Williams, T. C. R. (2015).** Tobacco guard cells fix CO₂ by both Rubisco and PEPcase while sucrose acts as a substrate during light-induced stomatal opening. *Plant, Cell & Environment* **38**:2353–2371.
- Daloso, D. M., Medeiros, D. B., Anjos, L. dos, Yoshida, T., Araújo, W. L., and Fernie, A. R. (2017).** Metabolism within the specialized guard cells of plants. *New Phytologist* **216**:1018–1033.

- DiMario, R. J., Clayton, H., Mukherjee, A., Ludwig, M., and Moroney, J. V.** (2017). Plant Carbonic Anhydrases: Structures, Locations, Evolution, and Physiological Roles. *Molecular Plant* **10**:30–46.
- Ehonen, S., Yarmolinsky, D., Kollist, H., and Kangasjärvi, J.** (2017). Reactive Oxygen Species, Photosynthesis, and Environment in the Regulation of Stomata. *Antioxidants & Redox Signaling* Advance Access published December 14, 2017, doi:10.1089/ars.2017.7455.
- Engineer, C. B., Hashimoto-Sugimoto, M., Negi, J., Israelsson-Nordström, M., Azoulay-Shemer, T., Rappel, W.-J., Iba, K., and Schroeder, J. I.** (2016). CO₂ Sensing and CO₂ Regulation of Stomatal Conductance: Advances and Open Questions. *Trends in Plant Science* **21**:16–30.
- Freudenberger, H.** (1940). Die Reaktion der Schliesszellen auf Kohlensäure und Sauerstoffentzug. *Protoplasma* **35**:15–54.
- Fujita, T., Noguchi, K., and Terashima, I.** (2013). Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytologist* **199**:395–406.
- Goh, C.-H., Dietrich, P., Steinmeyer, R., Schreiber, U., Nam, H.-G., and Hedrich, R.** (2002). Parallel recordings of photosynthetic electron transport and K⁺-channel activity in single guard cells. *The Plant Journal* **32**:623–630.
- Hashimoto-Sugimoto, M., Higaki, T., Yaeno, T., Nagami, A., Irie, M., Fujimi, M., Miyamoto, M., Akita, K., Negi, J., Shirasu, K., et al.** (2013). A Munc13-like protein in *Arabidopsis* mediates H⁺-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nature Communications* **4**:2215.
- Heath, O. V. S.** (1948). Control of Stomatal Movement by a Reduction in the Normal Carbon Dioxide Content of the Air. *Nature* **161**, 179–181.
- Hedrich, R.** (2012). Ion Channels in Plants. *Physiological Reviews* **92**:1777–1811.
- Hetherington, A. M., and Woodward, F. I.** (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**:901–908.
- Hörak, H., Sierla, M., Töldsepp, K., Wang, C., Wang, Y.-S., Nuhkat, M., Valk, E., Pechter, P., Merilo, E., Salojärvi, J., et al.** (2016). A Dominant Mutation in the HT1 Kinase Uncovers Roles of MAP Kinases and GHR1 in CO₂-induced Stomatal Closure. *The Plant Cell* Advance Access published January 1, 2016, doi:10.1105/tpc.16.00131.
- Horrer, D., Flütsch, S., Pazmino, D., Matthews, J. S. A., Thalmann, M., Nigro, A., Leonhardt, N., Lawson, T., and Santelia, D.** (2016). Blue Light Induces a Distinct Starch Degradation Pathway in Guard Cells for Stomatal Opening. *Current Biology* **26**:362–370.
- Hu, H., Rappel, W.-J., Occhipinti, R., Ries, A., Böhmer, M., You, L., Xiao, C., Engineer, C. B., Boron, W. F., and Schroeder, J. I.** (2015). Distinct Cellular Locations of Carbonic Anhydrases Mediate Carbon Dioxide Control of Stomatal Movements. *Plant Physiology* **169**:1168–1178.

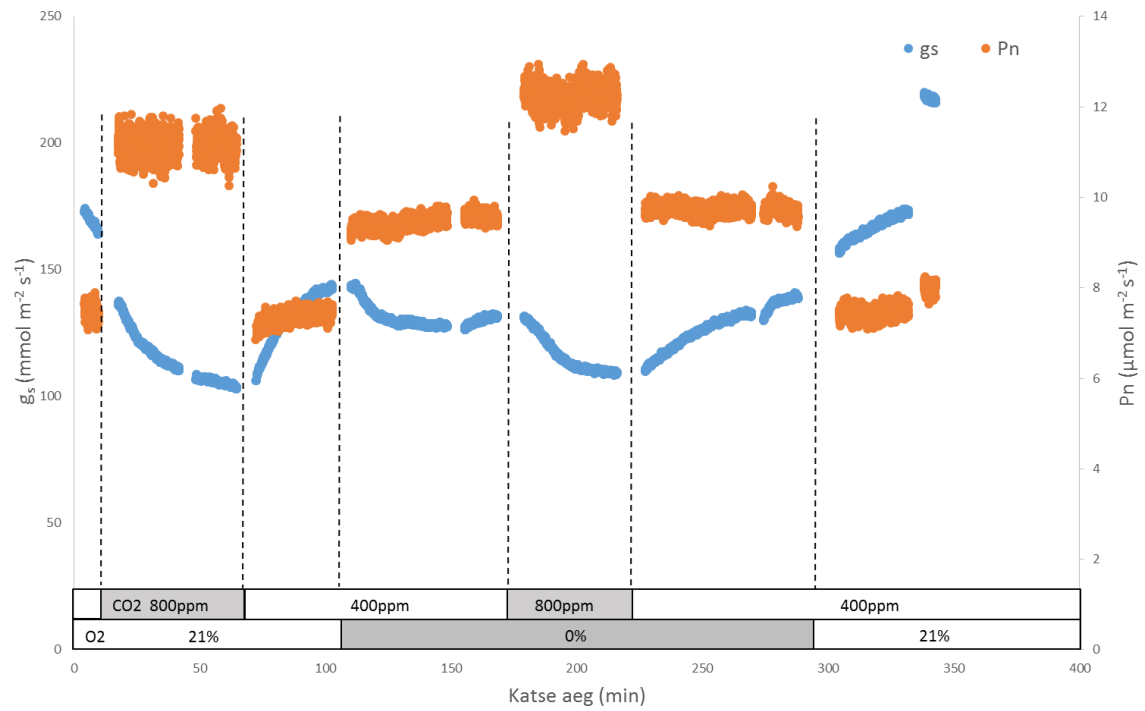
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K. A. S., Irene, M., Dietmar, G., and Rainer, H.** (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal* **74**:372–382.
- Keys, A. J.** (1986). Rubisco: its role in photorespiration. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **313**:325–336.
- Kollist, T., Moldau, H., Rasulov, B., Oja, V., Rämme, H., Hüve, K., Jaspers, P., Kangasjärvi, J., and Kollist, H.** (2007). A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact Arabidopsis and its absence in *abi2* mutant. *Physiologia Plantarum* **129**:796–803.
- Kollist, H., Nuhkat, M., and Roelfsema, M. R. G.** (2014). Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytologist* **203**:44–62.
- Lascève, G., Leymarie, J., and Vavasseur, A.** (1997). Alterations in light-induced stomatal opening in a starch-deficient mutant of Arabidopsis thaliana L. deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant, Cell & Environment* **20**:350–358.
- Lawson, T., and Blatt, M. R.** (2014). Stomatal Size, Speed, and Responsiveness Impact on Photosynthesis and Water Use Efficiency¹[C]. *Plant Physiol* **164**:1556–1570.
- Lee, M., Choi, Y., Burla, B., Kim, Y.-Y., Jeon, B., Maeshima, M., Yoo, J.-Y., Martinoia, E., and Lee, Y.** (2008). The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nature Cell Biology* **10**:1217–1223.
- Lloyd, F. E.** (1908) The physiology of stomata (No. 82). Carnegie Institution of Washington.
- Mackenzie, S., and McIntosh, L.** (1999). Higher Plant Mitochondria. *The Plant Cell* **11**:571–585.
- MacRobbie, E. a. C.** (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **353**:1475–1488.
- McLachlan, D. H., Lan, J., Geilfus, C.-M., Dodd, A. N., Larson, T., Baker, A., Hörak, H., Kollist, H., He, Z., Graham, I., et al.** (2016). The Breakdown of Stored Triacylglycerols Is Required during Light-Induced Stomatal Opening. *Current Biology* **26**:707–712.
- Medlyn, B. E., Barton, C. V. M., Broadmeadow, M. S. J., Ceulemans, R., Angelis De, P., Forstreuter, M., Freeman, M., Jackson, S. B., Kellomäki, S., Laitat, E., et al.** (2008). Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration: a synthesis. *New Phytologist* **149**:247–264.
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Müller, A., et al.** (2007). Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *The EMBO Journal* **26**:3216–3226.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M. E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C., Fermani, S., Trost, P., et al.** (2013). Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Front. Plant Sci.* **4**.

- Morison, J. I. L.** (1987) Intercellular CO₂ Concentration and Stomatal Response to CO₂. In: Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR, editors. *Stomatal Function*. Stanford, CA: Stanford University Press;. p. 229-251
- Mott, K. A.** (1988). Do Stomata Respond to CO₂ Concentrations Other than Intercellular? *Plant Physiology* **86**:200–203.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., and Iba, K.** (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**:483–486.
- Outlaw, W. H., Mayne, B. C., Zenger, V. E., and Manchester, J.** (1981). Presence of Both Photosystems in Guard Cells of *Vicia faba* L: IMPLICATIONS FOR ENVIRONMENTAL SIGNAL PROCESSING. *Plant Physiology* **67**:12–16.
- Pfister-Sieber, M., and Brändle, R.** (1994). Aspects of plant behaviour under anoxia and post-anoxia. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences* **102**:313–324.
- Raghavendra, A. S.** (1981). Energy Supply for Stomatal Opening in Epidermal Strips of *Commelina benghalensis*. *Plant Physiology* **67**:385–387.
- Roelfsema, M. R. G., and Hedrich, R.** (2005). In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate.' *New Phytologist* **167**:665–691.
- Sachs, M. M., Subbaiah, C. C., and Saab, I. N.** (1996). Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *Journal of Experimental Botany* **47**:1–15.
- Saraste, M.** (1999). Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**:1488–1493.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods* **9**:671–675.
- Schroeder, J. I., and Hagiwara, S.** (1989). Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**:427–430.
- Schroeder, J. I., Hedrich, R., and Fernandez, J. M.** (1984). Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **312**:361–362.
- Schwartz, A., and Zeiger, E.** (1984). Metabolic energy for stomatal opening. Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta* **161**:129–136.
- Shimazaki, K.** (1989). Ribulosebisphosphate Carboxylase Activity and Photosynthetic O₂ Evolution Rate in *Vicia* Guard-Cell Protoplasts. *Plant Physiology* **91**:459–463.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., and Kinoshita, T.** (2007). Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology* **58**:219–247.
- Snyder, K. A., Richards, J. H., and Donovan, L. A.** (2003). Night-time conductance in C₃ and C₄ species: do plants lose water at night? *J Exp Bot* **54**:861–865.
- Sojka, R. E.** (1992). Stomatal closure in oxygen-stressed plants. In *Soil Science*, pp. 154–269.

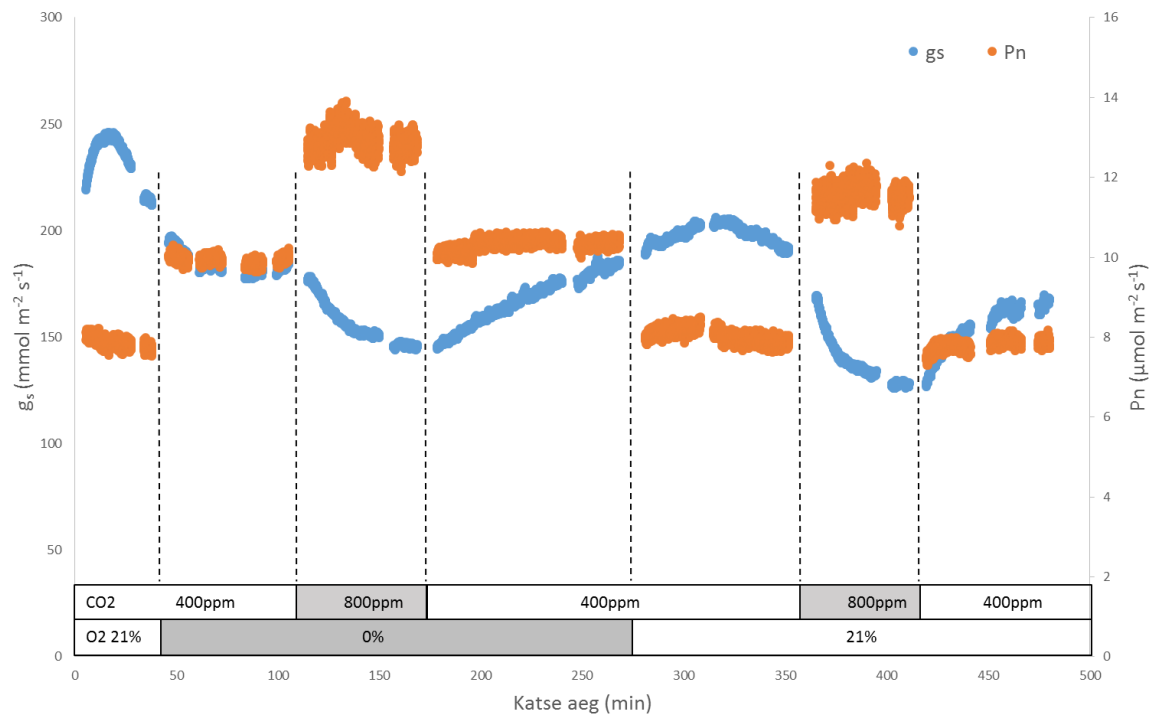
- Stadler, R., Büttner, M., Ache, P., Hedrich, R., Ivashikina, N., Melzer, M., Shearson, S. M., Smith, S. M., and Sauer, N.** (2003). Diurnal and Light-Regulated Expression of AtSTP1 in Guard Cells of Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**:528–537.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., and Miller, G.** (2011). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **35**:259–270.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M. and Murphy, A.** 2014. Plant Physiology and Development. Sinauer Associates, Massachusetts, U.S.A
- Tcherkez, G., Cornic, G., Bligny, R., Gout, E., and Ghashghaie, J.** (2005). In Vivo Respiratory Metabolism of Illuminated Leaves. *Plant Physiology* **138**:1596–1606.
- Tominaga, M., Kinoshita, T., and Shimazaki, K.** (2001). Guard-Cell Chloroplasts Provide ATP Required for H⁺ Pumping in the Plasma Membrane and Stomatal Opening. *Plant Cell Physiol* **42**:795–802.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., et al.** (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**:487–491.
- Vani, T., and Raghavendra, A. S.** (1994). High Mitochondrial Activity but Incomplete Engagement of the Cyanide-Resistant Alternative Pathway in Guard Cell Protoplasts of Pea. *Plant Physiology* **105**:1263–1268.
- Vanlerberghe, G. C., and McIntosh, L.** (1997). ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**:703–734.
- Wang, S.-W., Li, Y., Zhang, X.-L., Yang, H.-Q., Han, X.-F., Liu, Z.-H., Shang, Z.-L., Asano, T., Yoshioka, Y., Zhang, C.-G., et al.** (2014). Lacking chloroplasts in guard cells of crumpled leaf attenuates stomatal opening: both guard cell chloroplasts and mesophyll contribute to guard cell ATP levels. *Plant, Cell & Environment* **37**:2201–2210.
- Willmer, C. M. and Fricker, M.** 1996. Stomata. Chapman & Hall, London, UK.

Lisad

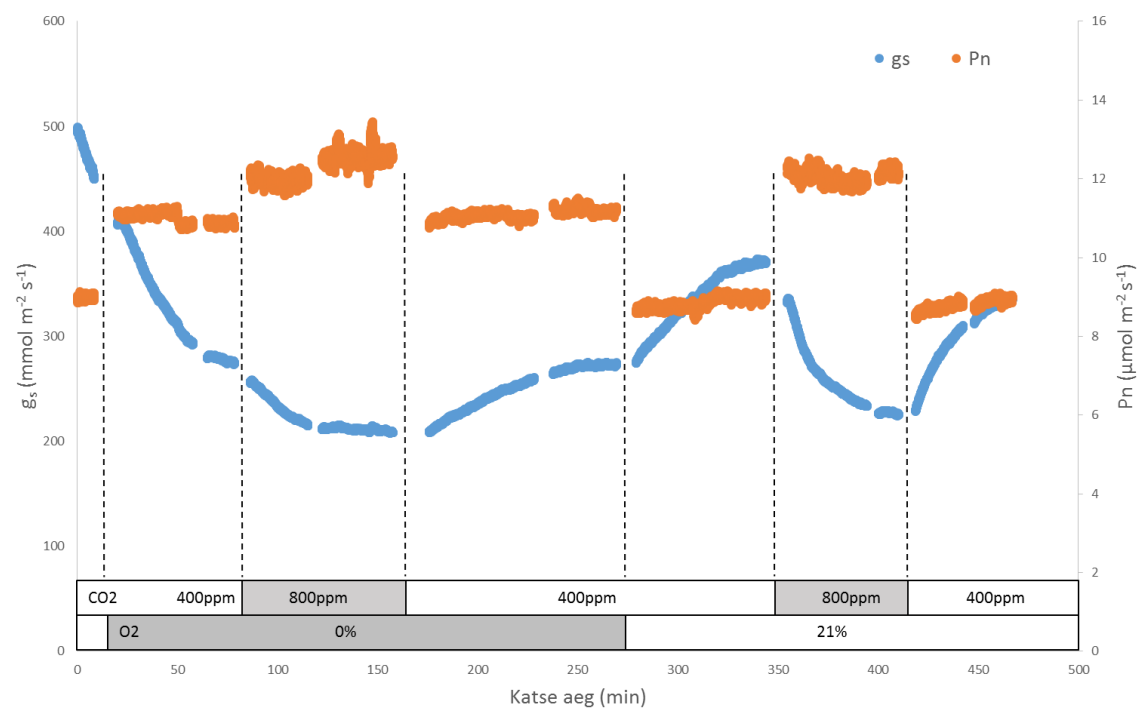
Lisa 1



Kõrge süsihappegaasi katse, 25.01.2018.

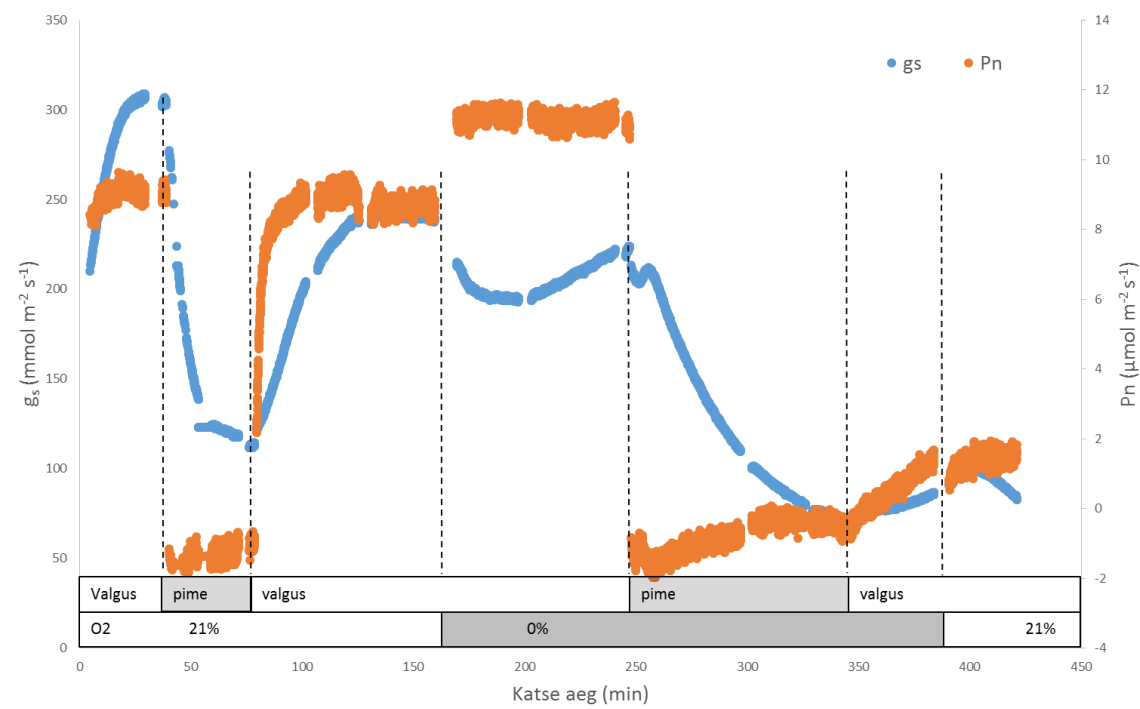


Kõrge süsihappegaasi katse, 29.01.2018.

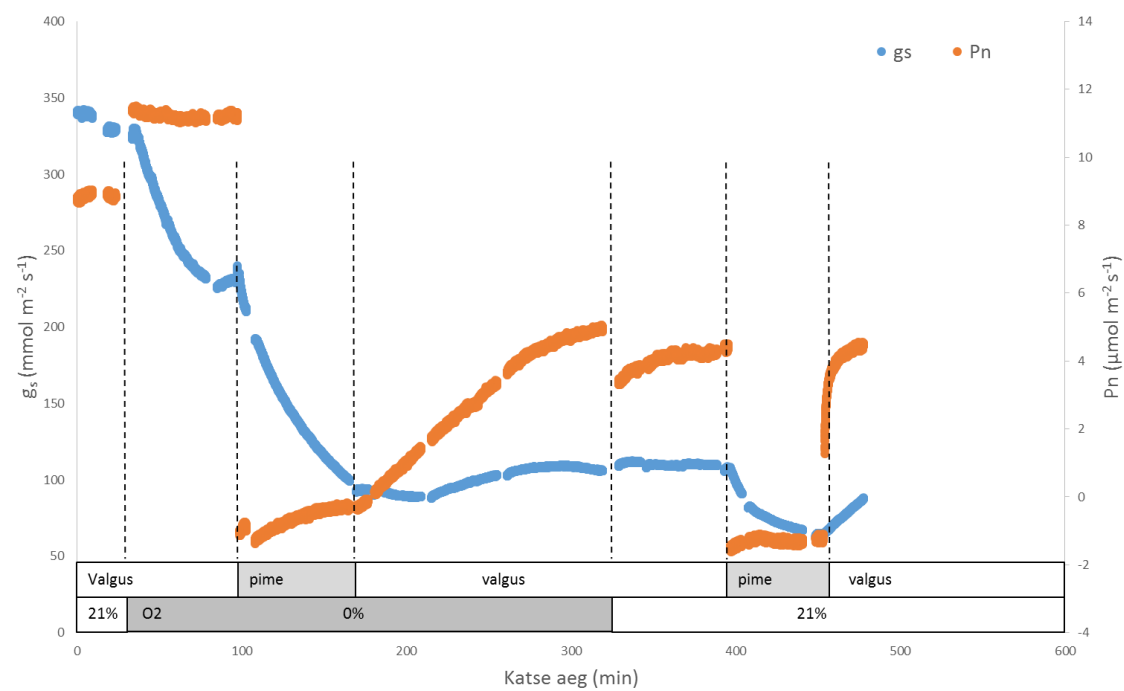


Kõrge süsihappegaasi katse, 01.02.2018

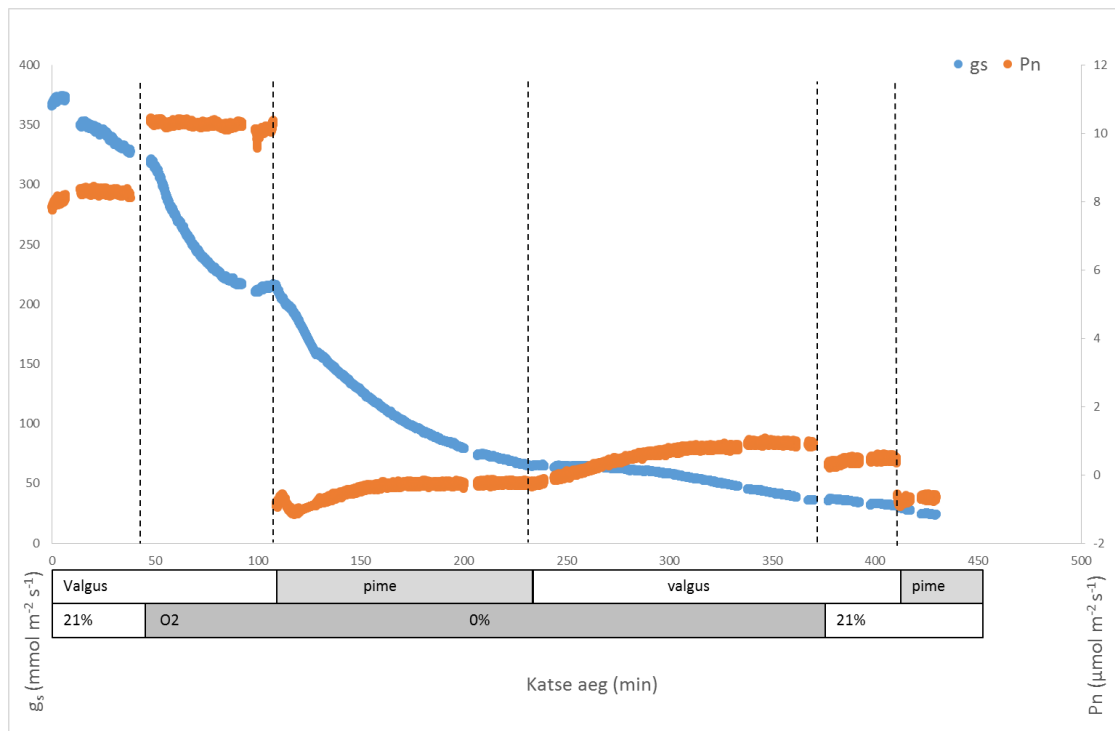
Lisa 2



Pimeduskatse, 24.01.2018



Pimeduskatse, 30.01.2018



Pimeduskatse, 02.01.2018

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Triinu Arjus,

(sünnikuupäev: 26.06.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede regulatsioon anoksilises keskkonnas,
mille juhendaja on Joachim Matthias Gerhold,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018